

**TERAPIA CELULAR CON CÉLULAS TRONCALES
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (ADSC) PARA
MEJORAR EL PROCESO DE REPARACIÓN DE
DEFECTOS ÓSEOS EN UN MODELO ANIMAL**

Alonso Carlos Moreno García

Directores

Prof. Dr. Enrique Gil Garay

Dr. Fernando de Miguel Pedrero

TABLA DE CONTENIDOS

PREFACIO	1
OBJETIVOS DEL PROYECTO	1
1. CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	2
1.1. La célula troncal: conceptos generales	3
1.2. Células troncales esqueléticas	6
1.3. Células troncales mesenquimales	9
1.4. Células mesenquimales estromales multipotentes derivadas de tejido adiposo	12
1.5. Fisiopatología de la reparación ósea y el papel de las células troncales	14
1.6. Modelos animales de reparación ósea.....	18
1.7. Histomorfometría	19
1.8. Sustitutos óseos	21
1.8.1. Sustitutos osteoconductores	21
1.8.2. Sustitutos óseos osteoinductores	23
1.8.3. Sustitutos óseos osteoformadores	23
1.9. El problema de la reparación ósea en la clínica	25
2. CAPÍTULO 2 MÉTODO	26
2.1. Obtención y caracterización de las células troncales mesenquimales de tejido adiposo ...	26
2.1.1. Aislamiento de las células troncales mesenquimales de tejido adiposo	26
2.1.2. Caracterización de las células troncales mesenquimales de tejido adiposo	27
2.1.2.1. Adhesión superficie plástica	28
2.1.2.2. Unidades formadoras de colonias de aspecto fibroblástico (CFU-F).....	28
2.1.2.3. Marcadores de superficie	28
2.1.2.4. Diferenciación osteogénica	29
- Mineralización de matriz extracelular	29
- Actividad de fosfatasa alcalina	29
- Expresión de osteocalcina	29

2.2.	Cultivo en Triosite® y métodos de valoración de biocompatibilidad y diferenciación a línea osteogénica	30
2.3.	Modelo animal de defecto óseo: técnica quirúrgica y vehiculización de las células	31
2.4.	Valoración histológica e histomorfométrica	34
2.5.	Estudio estadístico	35
3.	CAPÍTULO 3 RESULTADOS	36
3.1.	Aislamiento y cultivo de las células troncales derivadas de tejido adiposo	36
3.1.1.	Células procedentes de epiplón de conejo	36
3.1.2.	Células procedentes de grasa abdominal humana	37
3.2.	Caracterización de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo	40
3.2.1.	Marcadores de superficie	40
3.2.2.	Unidades formadoras de colonias	41
3.2.3.	Diferenciación osteogénica	41
3.2.3.1.	Mineralización de la matriz extracelular	41
3.2.3.2.	Actividad de la fosfatasa alcalina	42
3.2.3.3.	Expresión de osteocalcina	43
3.3.	Cariotipo	45
3.4.	Biocompatibilidad Triosite® – células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo	46
3.5.	Diferenciación de las células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo <i>in vitro</i> en Triosite®	47
3.5.1.	Mineralización de la matriz extracelular	47
3.5.2.	Actividad de la fosfatasa alcalina	48
3.5.3.	Expresión de osteocalcina	49
3.6.	Modelo animal y evolución clínica	50
3.6.1.	Definición del modelo	51
3.6.2.	Historia natural de la lesión	54
3.6.3.	Evolución clínica de los animales del ensayo	56

3.7. Reparación ósea	56
3.7.1. Estudio histológico	56
3.7.2. Estudio histomorfométrico	59
4. CAPÍTULO 4 DISCUSIÓN	61
4.1. Utilización de células troncales procedentes de grasa	61
4.2. Biocompatibilidad de Triosite® y caracterización del preparado	64
4.3. El modelo animal	66
4.4. Resultados histológicos e histomorfométricos	69
4.5. Aplicación de los resultados del estudio	80
5. CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXOS	90
ANEXO I: LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS (Leyendas)	90
ANEXO II: LISTADO DE ACRÓNIMOS	94

PREFACIO

El trabajo que presentamos pretende ahondar en el conocimiento de las propiedades de las células troncales derivadas de tejido adiposo (ADSC) y las posibilidades que estas ofrecen para la reparación de un tejido óseo lesionado.

Para ello hemos desarrollado un modelo animal de lesión ósea, hemos valorado la biocompatibilidad de un sustituto óseo que nos servirá de vehículo, aportando –por medio de la terapia celular– capacidad osteoinductiva y ostoformadora a un sustituto osteoconductor.

La traslación de los resultados es un objetivo a corto plazo y de hecho ya hemos desarrollado el protocolo y presentado al Comité Ético el ensayo clínico titulado **“Ensayo clínico fase II para evaluar el efecto del HC-SVT-1001 (células mesenquimales troncales adultas autólogas de tejido adiposo expandidas e incluidas en biomaterial de fosfato tricálcico) en el tratamiento quirúrgico de pseudoartrosis atróficas de huesos largos”**.

Este trabajo ha contado con el apoyo económico del FIS proyecto **PI07/0828**.

OBJETIVOS DEL PROYECTO

1	Conocer si las ADSC son capaces de crecer y sobrevivir sobre Triosite®.
2	Valorar la capacidad de diferenciación <i>in vitro</i> sobre Triosite®.
3	Desarrollar el modelo animal para valorar su efecto sobre la reparación ósea.
4	Conocer si la aplicación de ADSC, vehiculizadas en Triosite® y sobre un defecto óseo, estimula los procesos de reparación ósea.

1. CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

La Medicina Regenerativa es un apasionante campo que busca comprender cómo el organismo sana en condiciones normales, para aprovechar y ampliar ese proceso dónde y cuándo es más necesario. El descubrimiento de la existencia de células pluripotenciales en el tejido adulto ha supuesto un importante avance en esta línea, y nos ha enseñado cómo estas células intervienen en el proceso reparativo fisiológico, diferenciándose a células maduras que van a intervenir en la reparación del tejido dañado. Estas células tienen la capacidad de mantener y reemplazar células adultas tanto en el proceso de *turn over* fisiológico, como en respuesta a la lesión.

Durante el desarrollo embrionario las células adquieren su diferenciación específica, permitiendo la formación de órganos y tejidos. Pero incluso cuando el desarrollo y el crecimiento de un determinado animal se han completado, muchos órganos y tejidos mantienen un proceso de homeostasis en el que células que mueren son reemplazadas. Este hecho se mantiene en el proceso evolutivo desde los animales más primitivos como las esponjas, variando esta capacidad regenerativa en las diferentes especies y tejidos. Así, es bien conocida por todos, la capacidad de algunos anfibios para regenerar un miembro lesionado o la capacidad de regeneración de las células cerebrales de las aves. En los mamíferos se ha perdido gran parte de esta plasticidad tisular; sin embargo, es conocida la capacidad de regeneración del tejido hepático y muy especialmente de la piel. La epidermis, el pelo, el intestino delgado o el sistema hematopoyético son ejemplos de tejidos adultos que en el ser humano, de forma natural, están en un continuo proceso de renovación en el que nuevas células se diferencian para sustituir a aquellas que de forma fisiológica mueren, manteniendo de esta forma la función del tejido.

A continuación, profundizaremos en el concepto de célula troncal y abordaremos con especial interés las células troncales derivadas de tejido adiposo, que son las utilizadas en el estudio que se presenta.

Revisaremos el conocimiento actual de la reparación de la lesión ósea y sus implicaciones terapéuticas, así como los modelos animales descritos para su estudio. Por último, revisaremos los problemas con los que se enfrenta la Traumatología para el tratamiento de las lesiones óseas donde la Terapia Celular podría aportar soluciones.

1.1. La célula troncal: conceptos generales

“Los sistemas biológicos poseen mecanismos basados en el balance entre la muerte y la proliferación celular que preserva la forma y la función de los tejidos desarrollados, de forma que es, a través del constante cambio, que la apariencia de la mayoría de los organismos vivos permanece inalterada” [1]. La **célula troncal**, caracterizada por su capacidad de autoperpetuación y diferenciación, es la piedra angular de este rasgo de los seres vivos.

En 1869 Ernst Haeckel describe por primera vez la capacidad pluripotente de las células embrionarias [2] y en 1893 August Weismann diferencia aquellas células que transmiten características (germinales) de aquellas que desarrollan una función (somáticas) [3]. Desde entonces hasta hoy han sido muchos los avances que nos han conducido al concepto actual de célula troncal.

Podemos diferenciar dos tipos de células troncales: las **embrionarias** y las **adultas**.

Las **células troncales embrionarias** tienen la capacidad de diferenciarse a todas las estirpes celulares, por lo que también se denominan “**totipotentes**”. El desarrollo del cultivo y mantenimiento de las células troncales embrionarias humanas es un hecho relativamente reciente y publicado por Thomson en 1998 [4]. Los mecanismos de diferenciación de estas células son todavía poco conocidos, aunque en experimentación animal han sido descritos factores de crecimiento que permiten la diferenciación de estas células embrionarias a diferentes estirpes celulares. Su aplicación terapéutica a día de hoy no es técnicamente factible por la falta de control de la proliferación de estas células *in vivo*, produciendo teratomas. Es necesaria su previa diferenciación para su uso en la clínica. Por otra parte, los límites éticos de dicha utilización hacen de su uso y desarrollo un campo muy controvertido.

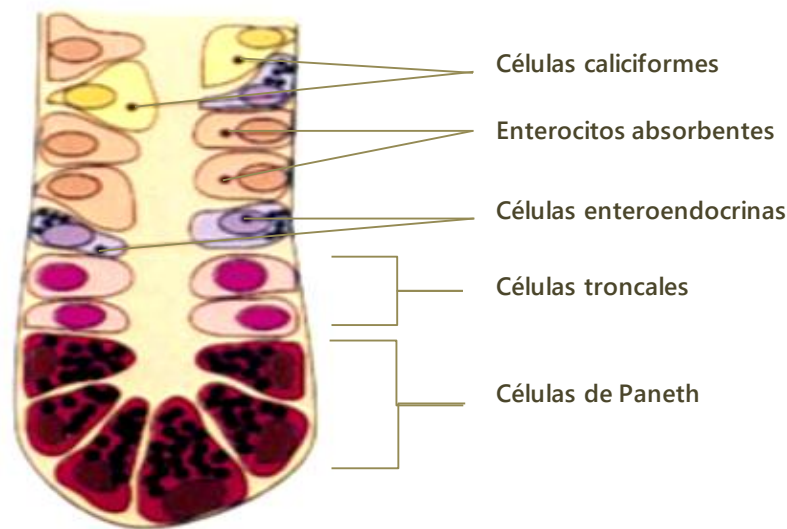
El concepto de **célula troncal adulta** se gesta en la década de los 60 tras los estudios en médula ósea. En los experimentos de Till y McCulloch se aisló una población de células clonogénicas procedentes de médula ósea, que era capaz de generar colonias mieloeritroides en el bazo de animales aplásicos tras irradiación letal [5]. Incluso células procedentes de estos animales podían ser transferidas a otros animales y reconstituir todas las líneas hematológicas [6]. Posteriormente estos descubrimientos fueron extrapolados a otros tejidos y líneas celulares [7]. El desarrollo posterior de técnicas de selección celular

basadas en anticuerpos monoclonales permitió el aislamiento de poblaciones “candidatas” a ser células troncales [8]. La reparación y mantenimiento tisular hace evidente la necesidad de la existencia de células con la plasticidad suficiente para su diferenciación y el mantenimiento de la función de los tejidos en los organismos multicelulares. Las células troncales adultas son células quiescentes que ante señales específicas del medio bien generan nuevas células troncales o inician un programa concreto de diferenciación hacia una estirpe celular. Previa a la diferenciación, la célula troncal habitualmente inicia un proceso de activación con una rápida proliferación. Tras esta fase de amplificación celular, estas células inician el programa de diferenciación final. Estas son las características esenciales que definen a la célula troncal: su capacidad de dividirse y crear nuevas células troncales: autoperpetuación; y la capacidad de diferenciarse hacia una línea celular específica: diferenciación. Esta diferenciación pasa por la producción de células progenitoras ya sin capacidad de autoperpetuación.

El estudio de los mecanismos por los cuales se ponen en marcha estos ciclos celulares es un campo de gran interés y aún poco conocido. La localización de las células troncales adultas en los llamados nichos celulares parece jugar un papel muy importante en estos procesos. Conocemos hoy la existencia de nichos de células troncales en diferentes tejidos adultos: la dermis, el folículo piloso, la mucosa intestinal, el tejido neural (células ependimales), la médula ósea, entre otros. En el caso específico del epitelio intestinal, el intestino delgado está formado por microvellosidades donde se encuentran las criptas celulares. Cada cripta está formada por unas 250 células, dentro de las cuales se encuentran las células troncales. Estas células están localizadas cerca de la base y mantienen la homeostasis del tejido multiplicándose y diferenciándose hacia cada una de las líneas celulares que conforman las microvellosidades: enterocitos, células secretoras, células enteroendocrinas y células de Paneth en la base de la cripta. Las células muertas se desprenden y pasan al lumen intestinal y son reemplazadas por células procedentes de las células troncales del nicho celular [9]. La puesta en marcha de diferentes programas de diferenciación que darán lugar a las diferentes estirpes celulares del tejido en el que se encuentran, probablemente seleccionados por señales en el microambiente celular, y la capacidad de migración de estas células, son características comunes de las células troncales de los diferentes tejidos. Hoy sabemos que la impronta del microambiente en la determinación de la línea de diferenciación celular es incluso

más importante que la de la procedencia de la célula troncal. Y así se ha demostrado cómo células troncales del sistema nervioso central, en un modelo murino, al ser trasplantadas a un ratón en el que se ha inducido una aplasia medular, se comportan como células troncales de médula ósea dando lugar a granulocitos, macrófagos y linfocitos B con expresión de beta-galactosidasa, marcador del origen neural de las células troncales trasplantadas [10].

Figura 1 Cripta del epitelio intestinal.



Si bien la mayoría de las descripciones sobre la localización de las células troncales se refieren a su restricción en compartimentos o nichos, existen sistemas en los que estas células no se encuentran en una localización determinada y están “esparcidas” en el tejido adulto. Un ejemplo es el caso de los miocitos, las células troncales encargadas de su reparación no se encuentran en un compartimento identificable [11].

Otro hecho importante es el estudio del fenotipo de las células troncales. Inicialmente se presupuso que serían células indiferenciadas a la manera de las células embrionarias y, por tanto, carentes de los marcadores que definen a las células adultas de los diferentes tejidos. Sin embargo, existen estudios que destacan la presencia en las células troncales de marcadores propios de células diferenciadas del tejido en el que se encuentran. Un ejemplo de ello es la expresión de queratina 5 y 14 en las células troncales del folículo piloso, hecho que define por otra parte al queratinocito, célula diferenciada de la epidermis [12]. La presencia de marcadores de células adultas en las células troncales ha propiciado la reflexión en el mundo científico sobre los conceptos de diferenciación y plasticidad celular.

Retomando el concepto clásico de diferenciación celular acuñado por Weismann a finales del siglo XIX, las “células somáticas” en su desarrollo quedarían irreversiblemente restringidas en su capacidad de diferenciación a un solo tipo celular. Sin embargo, la plasticidad de las células embrionarias en fase de diferenciación fue puesta de manifiesto por trabajos de la misma época realizados por Haeckel, Proescholdt y otros autores, quienes demostraron que la diferenciación de las células embrionarias no era irreversible y que sus programas de diferenciación podían ser reprogramados experimentalmente [13].

Hoy sabemos que esta plasticidad no sólo existe en la célula embrionaria, también células diferenciadas en tejidos adultos tienen la capacidad de desdiferenciación. Esta capacidad fue puesta de manifiesto inicialmente en animales simples como esponjas, planarias y medusas. Pero hoy contamos con estudios que demuestran cómo la manipulación celular y cambios en el ambiente celular conllevan la desdiferenciación de células en animales más complejos. En 2007 Takahashi y Yamanaka, por medio de la introducción de factores de transcripción, consiguieron transformar fibroblastos humanos en células casi idénticas a células troncales embrionarias, las llamadas *induced pluripotent stem cells*: iPSC [14]. Estos hallazgos nos hacen hoy en día considerar que el hecho de la desdiferenciación puede ser un mecanismo “fisiológico” del comportamiento celular adulto y abren la puerta a un nuevo concepto en relación a la fuente de las células pluripotenciales adultas, considerando que al menos en parte se trata de células que sufren una desdiferenciación en ciertas condiciones ambientales como puede ser la enfermedad, la lesión o el envejecimiento [15].

1.2. Células troncales esqueléticas

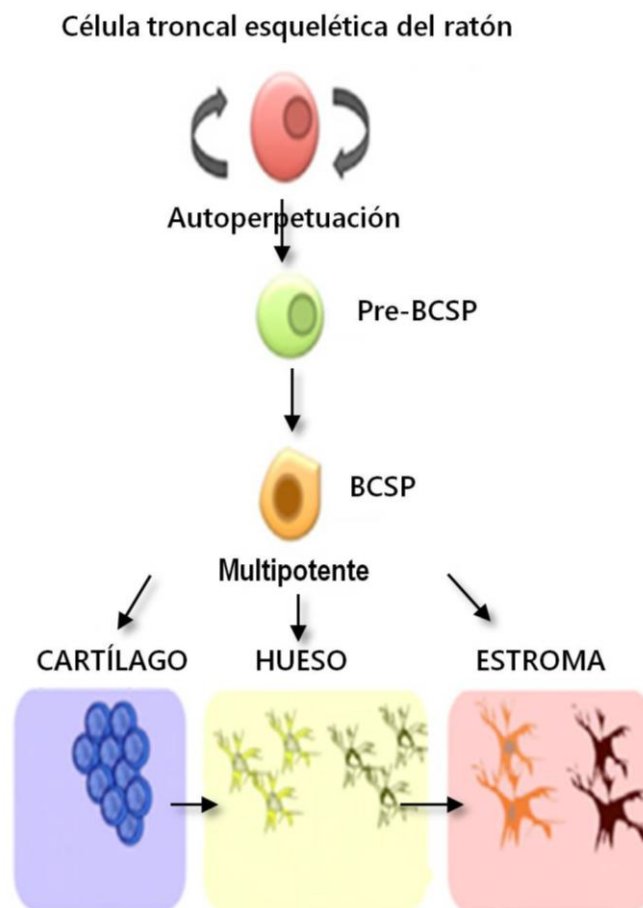
No ha sido hasta 2015 que se ha descrito la existencia de una población de células troncales específicas del aparato locomotor / tejido esquelético. Hasta entonces se presuponía la existencia de una población de células troncales que actuaría en el crecimiento, remodelación y reparación ósea, y que se encontraría en la médula ósea. Estas células darían lugar a osteoblastos maduros, condrocitos, adipocitos y células estromales, y se encontrarían en los sinusoides de la médula ósea [16]. Sin embargo, estudios más recientes ponen en tela de juicio este concepto, ya que las células perisinusoidales sólo dan lugar a líneas celulares osteoadipogénicas en animales adultos, con lo que no participarían en el crecimiento óseo de

las zonas fisarias, y no ha sido posible el desarrollo de una línea de producción de condrocitos, necesarios para la osificación endocondral fisiológica del hueso [17, 18]. En enero de 2015 han aparecido simultáneamente dos investigaciones que revelan la existencia de células troncales específicas para el tejido esquelético [19, 20]. La búsqueda de regiones anatómicas con células de características clonales en animales de experimentación ha demostrado su existencia en el hueso, cartílago y estroma de la médula ósea, pero no en tejido adiposo o músculo, lo que significa que el hueso, cartílago y tejido estromal de la médula ósea derivan *in vivo* de un linaje específico de células troncales y progenitoras que, además, no dan lugar a células musculares, grasas o hematopoyéticas. Estos autores han sido capaces de identificar células progenitoras específicas para cada una de estas líneas celulares, como ocurre con las líneas progenitoras hematopoyéticas. Asimismo, han podido identificar el inmunofenotipo de la célula troncal esquelética tanto *in vitro* como *in vivo*, confirmando su capacidad de autorreplicación y de diferenciación a líneas progenitoras. El inmunofenotipo de la célula troncal esquelética es: CD45- (hematopoyéticas -), Ter-119-(hematopoyéticas -), Tie2-(hematopoyéticas - y vasculares -), AlphaV+ (osteoblastos +), Thy- , CD3-, CD105-, CD200+. El control de la expansión de estas células troncales está estrechamente ligado al sistema BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*), siendo el equilibrio entre señales pro- y anti-BMP la base del control de su expansión que, a su vez, están producidas por las propias células troncales y progenitoras en el nicho celular. De hecho, la expresión del antagonista de BMP, gremlin-1, permite definir la población de células troncales óseas [20]. Estas células se encuentran concentradas en la metáfisis de los huesos largos. Además de receptores para la familia BMP, se han identificado en estas células receptores para moléculas de otras rutas de señalización: Hedgehog, FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) y Notch.

Muy interesante es el estudio realizado por Chan y cols. [19] en un modelo murino de fractura de fémur. Observan los autores una amplificación muy importante de la población de células troncales, apoyando la existencia de señales externas que alterarían la homeostasis del nicho de esta población celular. La diferenciación de las células progenitoras hacia hueso o cartílago estaría orquestada de forma paracrina, consecuencia de la interrelación entre las propias células del nicho. El VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) tendría un papel importante en dicha regulación, siendo bien conocida la capacidad de regulación condrogénica de este factor [21].

Posibles alteraciones en la regulación paracrina del nicho se han propuesto como posibles líneas de estudio en la etiopatogénesis de la artrosis, al favorecer la línea osteogénica sobre la condrogénica de las células troncales esqueléticas.

Figura 2 Propuesta de Chan y cols. [19] del linaje de célula progenitora esquelética.



BCSP: hueso, cartílago y progenitor estromal; Pre-BCSP: pre-hueso, cartílago y progenitor estromal.

El estudio de la presencia de células troncales en el callo de fractura en el modelo murino de fractura de fémur reveló un incremento del número de estas células en más de 300 veces el valor basal [19]. Asimismo, comprobaron un incremento del potencial osteogénico de las células procedentes de callo. La irradiación, conocido factor de reducción de la consolidación de las fracturas, redujo de forma muy significativa la presencia de estas células, pudiendo estar este hecho en la base de las alteraciones de consolidación observado en los huesos irradiados.

1.3. Células troncales mesenquimales

De manera clásica se acepta que en la médula ósea existen células troncales hematopoyéticas, muy bien estudiadas y caracterizadas, y otro grupo de células con capacidad de autoperpetuarse (capacidad de generar *in vivo* células idénticas en fenotipo y potencialidad a ellas mismas) y multipotentes (capacidad de generar tejidos totalmente diferenciados *in vivo*) que se han denominado mesenquimales estromales, al proceder del estroma medular. Estas células han demostrado en experimentos clásicos su capacidad para formar todos los tejidos que conforman el hueso (osículos): hueso, cartílago, adipocitos, fibroblastos y estroma de soporte para la hematopoyesis [22]. Esta capacidad es el equivalente a la producción de teratomas por las células embrionarias pluripotentes trasplantadas *in vivo*, y la reconstitución de la hematopoyesis cuando las células troncales hematopoyéticas son trasplantadas en experimentos *in vivo*.

Por medio del cultivo celular ha sido posible separar las células hematopoyéticas de las estromales, dada la característica de estas últimas de ser adherentes al plástico. Un paso más fue demostrar que una única célula formadora de colonia, es capaz de formar dichos osículos, por lo que la multipotencia queda demostrada [23]. Finalmente, su capacidad de autoperpetuación queda de manifiesto cuando de los osículos formados por el trasplante de estas células es posible extraer nuevas células multipotentes [16].

A partir de los años 90, el concepto de célula troncal mesenquimal se amplió a todo tejido derivado del mesoderma, por tanto no epitelial y no hematopoyético. Esta ampliación del concepto vino de la mano del descubrimiento de células con características troncales en muchos otros tejidos [24, 25]. Se inició entonces un importante resurgir del interés tanto en las Ciencias Básicas como en la Medicina Traslacional por este tipo de células, cuyas posibilidades terapéuticas iban siendo cada vez más amplias. Se iniciaron numerosos estudios y ensayos con métodos diferentes de aislamiento y caracterización de las células troncales mesenquimales, lo que hacía cada vez más complejo comparar y contrastar los resultados que iban apareciendo.

En 2006 la Asociación Internacional de Terapia Celular definió, con el objetivo de unificar criterios y posibilitar así el desarrollo del conocimiento en este campo, los criterios mínimos que definen la célula troncal mesenquimal multipotente [26].

Los criterios son tres:

- Adherencia al plástico.
- Expresión de antígenos de superficie específicos.
- Capacidad de diferenciación multipotente.

La adherencia al plástico es una propiedad bien conocida de las células troncales mesenquimales y, aunque estas células pueden ser mantenidas en cultivo y expandidas sin adhesión, el protocolo de identificación requiere su adhesión a la superficie del frasco de cultivo.

La expresión de antígenos de superficie permite hoy una rápida identificación de las poblaciones celulares. Para la definición de las células troncales mesenquimales, estas deben expresar CD105, CD73 y CD90 en su superficie. Asimismo, se recomienda, en aras de la identificación formal de estas células, la negatividad de la expresión de marcadores propios de las líneas hematopoyéticas: CD45 es un marcador leucocitario, CD34 es un marcador de progenitores hematopoyéticos y de células endoteliales, y CD14 y CD11b se expresan fundamentalmente en monocitos y macrófagos. Los marcadores CD79 α y CD19 corresponderían a linfocitos B, y la molécula HLA-DR no se expresa en las células troncales mesenquimales, a no ser que estas sean estimuladas. Para la tipificación de las células troncales mesenquimales sería únicamente necesario la negatividad de uno de los dos marcadores macrofágicos y de uno de los marcadores de las células β . Por sí solo, el estudio de los marcadores de superficie puede ser equívoco en algunos casos [27], por lo que es imprescindible su conjunción con los otros dos criterios descritos. Es importante señalar que los marcadores enumerados son únicamente válidos para poblaciones de células humanas y no universales para todas las especies. En lo que se refiere a experimentación animal, existen algunas publicaciones que abordan la caracterización de los antígenos de superficie del ratón [28]. En lo que se refiere al conejo, animal utilizado en nuestro estudio, no existe publicada en nuestro conocimiento la caracterización de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo y sí las procedentes de médula ósea. En este último caso se alerta sobre las diferencias existentes con los marcadores presentes en el humano [29].

Por último, y como característica que mejor define a las células troncales mesenquimales, estas deben demostrar *in vitro* su capacidad de diferenciación a la línea osteoblástica, adipocítica y condroblástica. La diferenciación osteoblástica será demostrada con la tinción del cultivo con Rojo de Alizarina o von Kossa, para la línea adipocítica se utiliza el Oil Red O, y para la condroblástica el Alcian Blue o los estudios inmunohistoquímicos para colágeno tipo II. El estudio del cariotipo celular se recomienda, aunque no se considera un criterio, para descartar posibles anomalías cromosómicas que pueden acaecer especialmente en cultivos con gran número de pases.

Estos criterios aquí descritos son admitidos hoy por la comunidad científica, aunque existen autores que critican su escasa especificidad y la utilización de medios de cultivo específicos para la inducción de la diferenciación a las tres líneas celulares propuestas [30].

Finalmente, cabe señalar otra de las características especialmente relevantes de las células troncales mesenquimales adultas: su escasa inmunogenicidad, siendo etiquetadas como poblaciones inmunoprivilegiadas. Estas células expresan bajos niveles de moléculas HLA clase II y no expresan moléculas coestimuladoras: CD40, CD80 o CD86 [31]. Incluso se ha constatado el efecto inmunosupresor de estas células modulando la actividad de los linfocitos T, células NK y células dendríticas [32]. Esta actividad inmunomoduladora, que ha sido propuesta como posibilidad terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped, estaría mediada por la producción de prostaglandina E2 (PGE2).

Además de la actividad paracrina descrita en la inmunomodulación por parte de las células troncales, sabemos que estas células presentan propiedades antiapoptóticas, angiogénicas, quimiotácticas y antifibróticas; y sustentan la expansión y diferenciación de su propia población.

Muchos son los modelos animales de enfermedad en los que las células troncales mesenquimales han demostrado eficacia. En la mayoría de estos estudios se han utilizado células humanas en modelos murinos inmunocompetentes. En estos modelos las células humanas xenogénicas no son reconocidas por el sistema inmunológico del huésped, permitiendo su migración a tejidos inflamados, donde actuarían modulando el proceso inflamatorio y favoreciendo la reparación tisular [33, 34, 35, 36].

1.4. Células mesenquimales estromales multipotentes derivadas de tejido adiposo

En 2001 Zuk y cols. describieron la presencia de una población celular en el tejido adiposo que en cultivo presentaba proliferación y un crecimiento estable, y era capaz de diferenciarse *in vitro*, al ser cultivadas con factores específicos, hacia la línea osteogénica, adipogénica, miogénica y condrogénica. Especularon los autores entonces con la posibilidad de que se tratase de células multipotentes, semejantes a las células mesenquimales estromales troncales y que denominaron células del procesado del lipoaspirado [37]. Posteriormente, estos mismos autores caracterizaron estas células y demuestran que se trata de células mesenquimales estromales multipotentes y las denominaron *Adipose-Derived Stem Cells* (ADSC, células troncales derivadas de tejido adiposo) [38]. La caracterización de las células troncales mesenquimales se realiza por el estudio de la expresión de proteínas específicas y la presencia de marcadores CD [39]. Zuk y cols. comprobaron que las ADSC expresaban marcadores CD (*cluster of differentiation*), similares a los observados en las células troncales mesenquimales de médula ósea. Así las ADSC eran positivas para CD29, CD44, CD71, CD90, CD105/SH2 y SH3, y negativas para CD31, CD34, y CD45. Sin embargo, existen dos marcadores que difieren entre las dos líneas celulares: las ADSC son positivas para CD49d y negativas para CD106, ocurriendo lo contrario para las células troncales mesenquimales procedentes de médula ósea. Este hecho, junto a diferencias en la expresión génica, también estudiadas por Zuk y cols., confieren a las ADSC una especificidad como célula troncal, y constata que no se trata de células troncales mesenquimales procedentes de médula ósea y migradas al tejido graso.

Las ADSC tienen la capacidad de diferenciarse a múltiples líneas celulares mesodérmicas: hueso, cartílago, grasa, músculo; e incluso Zuk y cols. sugirieron la posibilidad de su diferenciación *in vitro* a células con fenotipo neuronal, lo que sugiere su potencial capacidad ectodérmica. Existen trabajos que avalan la capacidad de diferenciación a células "tipo neurona" de las células troncales mesenquimales, lo que sugeriría que las células troncales adultas no estarían restringidas por su procedencia mesodérmica [40]. Esta capacidad ectodérmica ha sido confirmada posteriormente en las ADSC por otros autores que han descrito su diferenciación a neuronas, oligodendrocitos, células de Schwann y células epidérmicas [41, 42, 43]. Incluso se ha descrito su diferenciación a células de la línea endodérmica como hepatocitos e islotes pancreáticos [44, 45].

De esta forma, las ADSC pasarían de ser, con su capacidad de diferenciación a las tres capas embrionarias, de pluripotentes a multipotentes como lo son las células troncales embrionarias. Una vez más señalar que se trata de estudios *in vitro* y que pueden no reflejar la situación real *in vivo*.

Las ADSC se obtienen por aspirado del tejido graso. Para aislar las células troncales se realiza una digestión con collagenasa a la que sigue una separación por centrifugación. Estas células presentan una morfología similar al fibroblasto y carecen de microgotas de grasa en su interior. Se realiza la expansión en monocapa en frascos estándar de plástico con un medio de cultivo que contiene 10% de suero bovino fetal [46]. Su obtención es sencilla y poco traumática, permite obviar los problemas éticos de las células embrionarias y, si las comparamos con la obtención de células troncales mesenquimales de médula ósea, el rendimiento es hasta 100 veces superior, con una media de 404.000 ± 206.000 células por mililitro de lipoaspirado [47].

Además de las características anteriormente señaladas de las ADSC, tiene gran importancia para su aplicación clínica la capacidad inmunorreguladora de estas células, así como sus propiedades paracrinas, antiapoptótica, antifibrótica y proangiogénica, ya descritas para las células troncales mesenquimales de médula ósea. Sabemos hoy que las ADSC presentan propiedades inmunomoduladoras sobre linfocitos B y T, células NK, monocitos y neutrófilos. Esta actividad se desarrolla por medio de mecanismos paracrinicos y sistemas de contacto celular. La actividad paracrina vendría mediada por el factor de crecimiento hepatocitario, prostaglandina-E2, factor transformante del crecimiento $\beta 1$ (TGF), indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), óxido nítrico, interleukina (IL)-10, IL-6, entre otros. De ellos, IDO presenta un papel fundamental en la actividad inmunomoduladora de las ADSC [48, 49, 50]. Sobre la inmunotolerancia inducida por las células troncales mesenquimales ya hemos hablado, señalar únicamente que las ADSC participan de esta característica, haciendo posible la utilización alogénica de estas células sin la necesidad de una supresión inmunitaria del huésped [51]. Esta capacidad de las células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (ADSCh) ha hecho que sea incluso factible su utilización como xenotrasplante, siendo habitual la utilización en experimentación animal de células ADSCh [52].

De igual forma que la Sociedad Internacional de Terapia Celular en 2006 propuso los criterios para la definición de células troncales mesenquimales, en 2013 presentó un documento de consenso sobre la definición de las células ADSC. Los marcadores de superficie que definen este grupo celular son CD90+, CD73+, CD105+, y CD44+, siendo CD45 y CD31 negativos. La positividad de CD36 y la negatividad de CD106 las distingue de las células troncales mesenquimales procedentes de médula ósea, que presentan un fenotipo opuesto. Además, las ADSC deben demostrar diferenciación adipocítica, condroblástica y osteoblástica y formación de colonias de tipo fibroblástico adheridas al plástico [53].

1.5. Fisiopatología de la reparación ósea y el papel de las células troncales

Tras la producción de una fractura se inicia un proceso reparativo de gran complejidad en el que intervienen múltiples factores que van a tener como objetivo la restauración de las características biomecánicas, morfológicas y bioquímicas del hueso sano. Este proceso de reparación es esencialmente un remodo del desarrollo embrionario del hueso, basado en el control e interrelación de los procesos de condrogénesis y osteogénesis. Estos procesos se encuentran regulados por la activación de numerosos genes, subrayando este hecho la complejidad de los mismos [54]. Las fases de la reparación ósea las podemos resumir en:

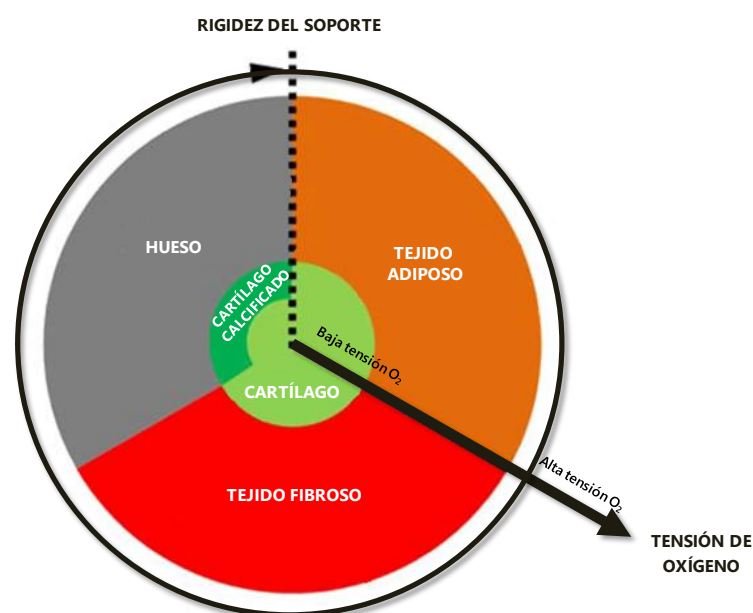
- Formación del hematoma y microambiente inflamatorio.
- Proliferación y diferenciación celular.
- Regeneración tisular:
 - Angiogénesis.
 - Osificación: intramembranosa y endocondral.
 - Remodelación.

En los primeros momentos de la lesión, la rotura de vasos producirá la extravasación sanguínea y la alteración del aporte sanguíneo local conduciendo a una necrosis del tejido. Las células afectadas producirán factores vasodilatadores y proinflamatorios que aumentarán la permeabilidad vascular. Se forma en este momento un microambiente rico en citoquinas, quimoquinas, factores de crecimiento y hormonas que estimularán la proliferación y expansión de células troncales y progenitoras locales.

La procedencia de estas células es aún hoy un tema de debate. El periostio y médula ósea, con el endostio considerado parte de la medular, serían las fuentes de su procedencia. Su capacidad y preferencia de diferenciación hacia una u otra línea celular estaría en parte guiada por su nicho de procedencia [55]. Se han descrito también la participación de células troncales procedentes de otros tejidos circundantes, teniendo en este caso especial importancia el tejido muscular [56]. Actualmente, Chan y cols. [19] describen la intervención de células troncales propias del tejido esquelético, recientemente caracterizadas, que serían las encargadas de esta reparación y que se localizan fundamentalmente en la metáfisis de los huesos largos. La participación de células troncales circulantes que migrarían al foco de la lesión no parece ser un mecanismo presente al menos en el humano [57].

Existen dos procesos de osificación en la reparación ósea: la intramembranosa y la endocondral. El desarrollo y prevalencia de una u otra dependerá en gran medida de las condiciones del foco de fractura en relación a estabilidad, vascularización y tensión local de O_2 . En un interesante trabajo, Burke y cols. proponen un modelo biomecánico que explica las relaciones entre tensión de O_2 y estabilidad como reguladores de la diferenciación celular durante la reparación ósea. De esta forma, microambientes con baja tensión de O_2 y poca estabilidad tienden a la diferenciación condral y producción de tejido fibroso, mientras que situaciones con mayor tensión de O_2 y mayor estabilidad tienden a la diferenciación osteoblástica y la producción de hueso [58].

Figura 3. Modelo biomecánico de diferenciación celular durante la reparación ósea según Burke, 2012 [58].

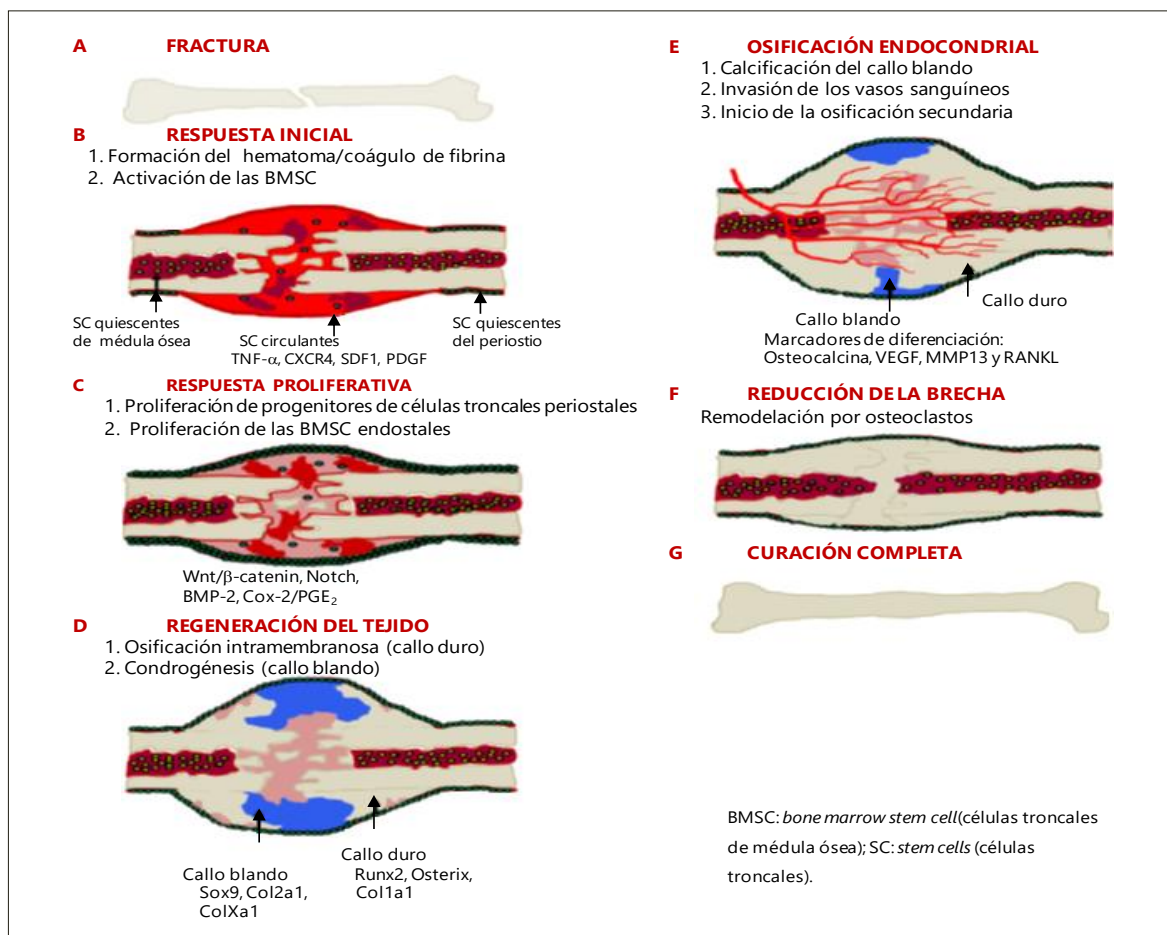


Sabemos por estudios *in vitro* y en modelos animales, que la hipoxia favorece la diferenciación de las células troncales hacia la línea condral [59, 60, 61]. Es por este motivo que la osificación endocondral, dependiente de la actividad condroblástica, se localiza en zonas de menor vascularización. En esta situación la célula troncal se diferenciará a la línea condral, y los condrocitos producirán cartílago que estabilizará la lesión, facilitando la angiogénesis. Se crea entonces una situación de estabilidad y mejora en la tensión de O₂ que favorece la diferenciación osteoblástica. El cartílago formado se calcifica y sobre él actuarán los osteoclastos y osteoblastos en el proceso de remodelación.

La osificación intramembranosa supone la producción de tejido óseo directamente por osteoblastos procedentes de la diferenciación de células troncales, y se produce en situaciones de estabilidad del foco de fractura y tensión de O₂ adecuada.

El osteoblasto es la célula ósea encargada de la síntesis de la matriz ósea extracelular orgánica (osteoide) y su mineralización posterior. Estas células también regulan la actividad osteoclástica, participando de esta forma en el remodelado óseo [62]. Los osteoblastos son células mononucleares y su morfología depende de su actividad celular: aplanadas en situación de quiescencia y ovoideas en su fase de actividad metabólica. Durante el proceso de formación ósea, el osteoblasto queda atrapado en la matriz por él producida y da lugar al osteocito. El osteocito es la célula más abundante en el tejido óseo y se comunican entre ellas y con el medio circundante por medio de largas prolongaciones citoplasmáticas. Estas células actúan como mecanorreceptores guiando la actividad osteoclástica y osteoblástica en los procesos de formación y remodelado óseo. La actividad del osteoblasto viene además regulada por receptores hormonales (estrógenos), factores de crecimiento y la actividad física [63]. La matriz ósea formada por los osteoblastos está constituida por el osteoide o matriz orgánica, que constituye el 22% de la matriz ósea. Esta matriz orgánica está formada en un 90% por colágeno, osteocalcina, fosfatasa alcalina, además de otras sialoproteínas, glicoproteínas y proteoglicanos. La matriz inorgánica constituye el 69% de la estructura ósea, y está compuesta esencialmente por hidroxiapatita. La matriz inorgánica proporciona al hueso su dureza y rigidez. La hidroxiapatita es un complejo cristalino de calcio y fosfato [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂], que se distribuye adherido a las fibras de colágeno. La procedencia del calcio y fósforo es la dieta y llega al hueso en el plasma sanguíneo.

Figura 4. Respuesta regenerativa a la fractura según Hadjiargyrou, 2014 [64].



Desde el punto de vista histológico, en un primer momento observaremos tras la fractura una hemorragia difusa que posteriormente se organiza en un coágulo que servirá de matriz para el asentamiento de células inflamatorias y fibroblastos, así como capilares neoformados. La alteración de los canales Harvesianos producirá la muerte de osteocitos a cierta distancia del foco y a cada lado de la fractura. Observaremos así en el hueso desvitalizado la presencia de osteocitos picnóticos. Sobre este hueso necrótico observaremos osteoclastos en el proceso de resorción. A partir de la primera semana se observan osteoblastos diferenciados que producen depósitos de osteoide sin seguir un patrón determinado. En este momento la celularidad es abundante en el foco de fractura. Puede aparecer también material condral, si existe osificación endocondrial, observando en estos casos áreas cartilaginosas floridas y desorganizadas con la presencia de condrocitos. A partir de la tercera semana se empieza a definir un patrón trabecular con la existencia de un recubrimiento osteoblástico. Se inicia el depósito de calcio. A partir de la sexta semana se inicia el remodelado guiado por las fuerzas mecánicas y se producirá un hueso maduro.

1.6. Modelos animales de reparación ósea

La investigación básica realizada *in vitro*, en su proceso de traslación a la clínica, debe corroborar sus conclusiones en modelos animales. Varios aspectos son esenciales a la hora de desarrollar un modelo animal: la disponibilidad, el coste, la capacidad e infraestructura del animalario, aceptabilidad social, y evidentemente propiedades biológicas semejantes a las del humano. En el caso concreto de los estudios de regeneración ósea tendremos que prestar especial atención a la estructura, composición y características del remodelado óseo del animal. Están descritos estudios de reparación ósea en ratones, ratas, conejos, perros, cerdos, cabras y ovejas. Cuanto mayor es la envergadura del animal, mejor es el modelo, más fácil su manipulación y más sólidas las conclusiones a la hora de su traslación al humano. Estas características, sin embargo, se acompañan de un aumento en el coste y en la dificultad de estabulación y mantenimiento del animal.

Para el tratamiento de la reparación ósea, se ha utilizado con frecuencia el defecto crítico. Este defecto sería la mínima lesión ósea que no se repara con formación de hueso durante toda la vida del animal. El tamaño de dicha lesión varía en función del animal estudiado. En el caso del conejo se considera un defecto crítico lesiones de 6 mm [65]. Lesiones menores en el mismo modelo se han utilizado en otros huesos, como en la tibia con lesiones de 4 mm, dado que lesiones mayores producían la fractura del hueso [66].

El conejo es uno de los animales más utilizados en experimentación animal. En lo que se refiere a estudios musculoesqueléticos, Neyt publicó un estudio en 1998 en el que observó que era el animal utilizado en el 35% de los experimentos publicados hasta entonces [67]. Entre el conejo y el humano existen importantes diferencias en su anatomía, en el tamaño, forma y distribución de las cargas. Desde el punto de vista microscópico también existen diferencias en su vascularización. Sin embargo, en lo que se refiere a su densidad mineral ósea y, por tanto, a su resistencia a la fractura, sí existen similitudes entre las dos especies. Por último, señalar que el conejo tiene un recambio y metabolismo óseo más rápido que el humano y otros mamíferos. Hecho que tenemos que tener en cuenta a la hora de diseñar los estudios [68].

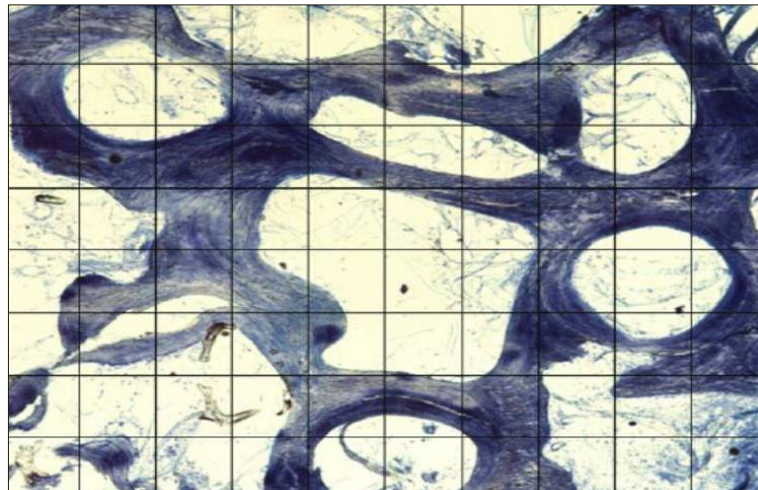
1.7. Histomorfometría

La histomorfometría se define como una evaluación cuantitativa de la microarquitectura ósea, su remodelamiento y metabolismo. Se evalúan aspectos dinámicos con la administración de Tetraciclina como marcador, o características estáticas del hueso. Los parámetros evaluados son bidimensionales, aunque es posible su conversión tridimensional aplicando fórmulas estereológicas. La introducción de la histomorfometría se la debemos a Harold Frost en los años 60, un traumatólogo norteamericano pionero en el estudio de la estructura ósea y su metabolismo. En los años 80 Parfitt unifica los criterios de evaluación histomorfométrica y, bajo el auspicio de la *American Society of Bone and Mineral Research*, publica su trabajo de consenso [69].

Una vez procesada y teñida la muestra ósea, la valoración se realiza por microscopía óptica, con la realización de fotografías sobre diferentes campos, que son procesadas en forma manual, semiautomática y automática. En la actualidad existen sistemas informáticos que facilitan la lectura de las preparaciones. Los parámetros analizados son:

- Parámetros estructurales: volumen óseo, espesor trabecular, número de trabéculas, separación entre trabéculas.
- Parámetros estáticos de formación ósea: espesor del osteoide, relación superficie de osteoide y superficie ósea, relación volumen de osteoide y volumen óseo, relación superficie recubierta de osteoblastos y superficie ósea.
- Parámetros dinámicos de formación ósea: relación de la superficie de mineralización y superficie ósea, velocidad de aposición mineral, retraso de mineralización, relación velocidad de formación ósea y superficie ósea.
- Parámetros estáticos de resorción: relación superficie recubierta por osteoclastos y superficie ósea, y relación superficie ósea resorbida y superficie ósea total.

Figura 5. Preparación para valoración de histomorfometría clásica.



La histomorfometría descrita precisa la no decalcificación del tejido óseo, lo que conlleva dificultades técnicas y, además, precisa de una formación y de un material altamente específico. Lane y Sandhu en 1987 describieron un sistema de gradación histológica para muestras decalcificadas y teñidas con hematoxilina/eosina [70]. Este sistema también permite una valoración cuantitativa, con menor dificultad técnica, consistente en valorar la unión, el hueso esponjoso y el cortical en una escala de 0 a 4 según las características cualitativas observadas al microscopio.

1.8. Sustitutos óseos

Los injertos y sustitutos óseos pueden ser naturales o sintéticos, y en función de sus características, se clasifican en:

- Osteoconductor: el material aporta el andamiaje necesario para la neoformación de hueso. La estructura tridimensional del mismo permite el desarrollo de la angiogénesis, la colonización por células osteoprogenitoras.
- Osteoinductor: es este caso el material estimula el reclutamiento y diferenciación de las células troncales hacia la línea osteoblástica.
- Osteogénico: en este caso el injerto/material aporta células con capacidad osteoblástica y por tanto capaces de la producción de hueso.

1.8.1. Sustitutos osteoconductores

Los sustitutos óseos sintéticos tienen la ventaja de no existir la posibilidad de transmisión de enfermedades, una disponibilidad ilimitada y el no lesionar tejidos donantes. Estos materiales han de ser biocompatibles (no tener un efecto tóxico ni inducir un fenómeno inflamatorio tras su implantación) y bioactivos (que permiten la aposición de tejido óseo directamente sobre su superficie).

Dentro de los sustitutos óseos en la actualidad contamos con:

- Colágeno: las estructuras de colágeno tienen capacidad conductiva para la deposición mineral, la angiogénesis y la adhesión de factores de crecimiento. No obstante, no proporciona soporte estructural por lo que utiliza en combinación con otros sustitutos.
- Sustitutos coralinos: el conocimiento de que la composición y estructura del exoesqueleto de los corales marinos era similar a la del hueso humano hizo que se estudiara las posibilidades de su uso como sustituto óseo. Está constituido por carbonato cálcico y puede utilizarse bien directamente o tras un proceso químico que lo transforma en hidroxiapatita [71].
Hidroxiapatita: se trata de una cerámica. Estas estructuras se forman por calentamiento y presurización de materiales no metálicos. Su desventaja es la baja resistencia a la fractura. Han sido utilizadas en cirugía del raquis, con especial aplicación en fusiones intervertebrales, y en el recubrimiento de materiales protésicos para mejorar su osteointegración [72, 73].
- Fosfato tricálcico: se trata de una cerámica que se ha desarrollado imitando la microarquitectura del hueso esponjoso, lo que permite el proceso de angiogénesis en su interior y la formación de hueso. Se trata de un material con un proceso de resorción más rápido que otras cerámicas.

Existen dos características importantes de los sustitutos óseos que intervienen en sus resultados clínicos: la porosidad y su resorción. Hoy sabemos que no es posible el crecimiento óseo en poros de entre 15 y 40 μm . La formación de osteoide requiere un poro mínimo de 100 μm , siendo el tamaño ideal descrito entre 300 y 500 μm [74].

Además del tamaño del poro, es importante la interconectividad de los mismos, hecho que mejora la tensión local de O_2 y, por tanto, facilita la diferenciación de las células troncales a la línea osteoblástica.

La resorción del sustituto óseo tras su implantación es un factor determinante para el éxito de la reparación. Materiales como la hidroxiapatita en los que su resorción es escasa pueden relacionarse con pobres resultados clínicos. Otros materiales como el fosfato tricálcico posee la característica de permitir su resorción tanto químicamente como mediada por células. Esta capacidad puede además ser modulada en función de parámetros estructurales modificables. Así se han descrito tiempos de resorción para el fosfato tricálcico de entre 6 y 24 meses en función de su composición [75]. La resorción del material también puede tener efectos deletéreos debido a procesos inflamatorios mediados por micropartículas y la inestabilidad mecánica asociada a la destrucción del material [76]. De esta forma, en la ingeniería de biomateriales, se han desarrollado compuestos mixtos buscando aunar efectos beneficiosos minimizando los deletéreos. Uno de estas combinaciones es la asociación de hidroxiapatita y fosfato tricálcico, dando lugar a una cerámica bifásica.

La utilización de la combinación hidroxiapatita y fosfato tricálcico ha demostrado buenos resultados en clínica. Ransford y cols. publicaron en 1998 su experiencia en la utilización de esta combinación para la consecución de la artrodesis en la cirugía de escoliosis. Se realizó un estudio prospectivo y aleatorizado de 341 pacientes que recibieron bien injerto autólogo o bloques de hidroxiapatita (60%) + fosfato β tricálcico (40%). No existieron diferencias entre los grupos y los autores presentan estudios histológicos de pacientes reintervenidos en los que se objetivó el adecuado crecimiento óseo [77]. Más recientemente, Hooper y cols. publican sus resultados con la utilización de la cerámica bifásica en pacientes sometidos a una osteotomía de apertura medial de tibia. Se trata de un estudio no comparativo, en el que se valora la evolución clínica y radiológica, y estudios histológicos en aquellos pacientes que sufrieron reintervención para la colocación de una prótesis total de rodilla. Se incluyeron 36 osteotomías en 33 pacientes. Todos los pacientes presentaban criterios radiológicos de consolidación, aunque el sustituto era visible años después de su implantación. Desde el punto de vista histológico, existía un abundante infiltrado óseo en las muestras estudiadas, aunque el injerto seguía siendo visible [78].

1.8.2. Sustitutos óseos osteoinductores

La osteoinducción es el proceso fisiológico que inicia y mantiene la mitogénesis de las células mesenquimales indiferenciadas y las conduce a la formación de células osteoprogenitoras con capacidad para formar nuevo hueso [79]. La regulación de este proceso es complejo y en él intervienen múltiples factores de crecimiento (TGF- β , BMP, FGF, IGF, PDGF, Wnt), de entre ellos destacamos la proteína morfogenética humana, que fue el primer factor descrito y que sabemos hoy forma parte de la superfamilia TFG- β [80]. Los sustitutos óseos osteoinductores serían aquellos que poseen las características antes mencionadas, y que en la actualidad son: matriz ósea desmineralizada y las BMP.

1.8.3. Sustitutos óseos osteoformadores

El proceso de reparación ósea exige la existencia de una matriz extracelular, factores de crecimiento y la existencia de células. Los sustitutos óseos osteoformadores deben contar con estos tres elementos, y de hecho este tipo de sustitutos se llevan empleando muchos años en la forma de injerto autólogo, y médula ósea. El problema de su limitada disponibilidad y el conocimiento creciente de la biología de las células troncales ha permitido el desarrollo en este campo: la ingeniería tisular.

La primera utilización documentada de injerto óseo se remonta a 1680 por un cirujano holandés: Job van Meekren. En 1980 Lindholm y Urist presentan sus resultados de la adición de médula ósea en un injerto óseo [81]. Posteriormente aparecerán múltiples trabajos con la inyección de médula ósea para el tratamiento de pseudoartrosis de tibia, así como numerosos experimentos en animales que demuestran el efecto osteoformador de la adición de médula ósea a distintos tipos de injertos [82]. Se trata en todos estos casos de células procedentes de médula ósea y, en la mayoría de los casos, se utilizan células sin caracterizar ni expandir. De los trabajos existentes podemos concluir que la aplicación de médula ósea es eficaz para facilitar la reparación ósea y que la combinación de una cerámica con médula ósea es una combinación que aporta resultados en experimentación animal similares a los del autoinjerto. La adición de BMP a estos compuestos tiene un efecto sinérgico y conduce a una mejoría de los resultados. Sin embargo, la traslación a la clínica de estos buenos resultados en experimentación animal no ha sido posible.

Existen múltiples publicaciones de la aplicación de médula ósea en pacientes con retrasos de consolidación o pseudoartrosis, pero no existe ningún estudio controlado al respecto. La mayor evidencia a día de hoy es de nivel III, el artículo publicado por Hernigou en 2005 [83].

La aplicación de la terapia celular y de la ingeniería de tejidos al campo de la Traumatología exige el desarrollo de materiales que sean eficaces para transportar las células a la zona lesionada, sean capaces de mantenerlas en dicha localización y faciliten su proliferación y diferenciación. En esta línea, estudios recientes valoran la biocompatibilidad y bioactividad de los sustitutos óseos. Seebach y cols. publicaron un importante estudio *in vitro* valorando la eficacia de la siembra de células mesenquimales troncales procedentes de médula ósea tras su aislamiento y expansión, así como su metabolismo y crecimiento sobre diferentes sustitutos óseos. Los mejores resultados se obtuvieron, primero, con la utilización de aloinjerto de esponjosa procesado y en segundo lugar con fosfato β tricálcico [84]. Los mismos autores han presentado más recientemente un estudio similar pero utilizando células no expandidas de médula ósea. Los resultados son similares, obteniendo los mejores datos con la utilización de matriz ósea desmineralizada y fosfato β tricálcico [85].

1.9. El problema de la reparación ósea en la clínica

La incidencia de la fractura ósea es en los países desarrollados es de 11,3 por 1.000 habitantes y año [86]. Esto supone un importante gasto económico, no solo por su tratamiento, sino también por los días de baja laboral que supone en personas laboralmente activas. Los accidentes de alta energía, especialmente los automovilísticos, son una causa frecuente de fractura ósea complicada, lo que aumenta la incidencia de retrasos de consolidación y pseudoartrosis. Por otra parte, los cambios demográficos, con poblaciones cada vez más envejecidas, facilita la aparición de fracturas debido a la prevalencia de la osteoporosis, aumentada en este grupo etario. Por otra parte, la malnutrición, la diabetes, el tabaquismo, la quimioterapia, la radioterapia, los corticoides, la infección, la presencia de tumores, o la inestabilidad del foco de fractura van a influir negativamente en la reparación ósea. Hasta el 10% de las fracturas presentan retraso de consolidación o no consolidación, y el gasto directo del tratamiento de estas complicaciones se ha calculado en 15.000 € por caso [87, 88].

Los injertos y sustitutos óseos son una herramienta indispensable en el armamentario del traumatólogo. Se utilizan para estimular y aumentar la formación de hueso ante la presencia de fracturas con retardo de consolidación o en pseudoartrosis, y en casos de defectos óseos secundarios a traumatismos, infección, o tumores. En el mundo se utilizan más de 2,2 millones de injertos óseos anualmente [89]. Existen tres tipos de injerto óseo: el injerto autólogo, el aloinjerto y el sustituto óseo. El injerto autólogo es el patrón oro al proporcionar los mejores resultados. Este injerto cuenta con capacidad oteoconductora, osteoinductora y osteoformadora al contar con una matriz biocompatible, la presencia de factores de crecimiento y células tanto progenitoras como diferenciadas. Sin embargo tiene la limitación de su disponibilidad y la posible aparición de complicaciones en la zona donante. El aloinjerto tiene capacidad osteoconductora, y dependiendo de su preparación también osteoinductora. Al no contar con células no es osteoformador. Además puede ser causa de transmisión de enfermedades infecciosas, así como de reacción inmunitaria. Por último, el sustituto óseo está compuesto por una matriz que puede ser natural o sintética, con capacidad osteoconductora. La ingeniería tisular trabaja en desarrollar sobre los sustitutos óseos capacidades osteoinductoras y osteoformadoras con la implementación de factores de crecimiento y células en sus matrices.

2. CAPÍTULO 2 MÉTODO

2.1. Obtención y caracterización de las células troncales mesenquimales de tejido adiposo

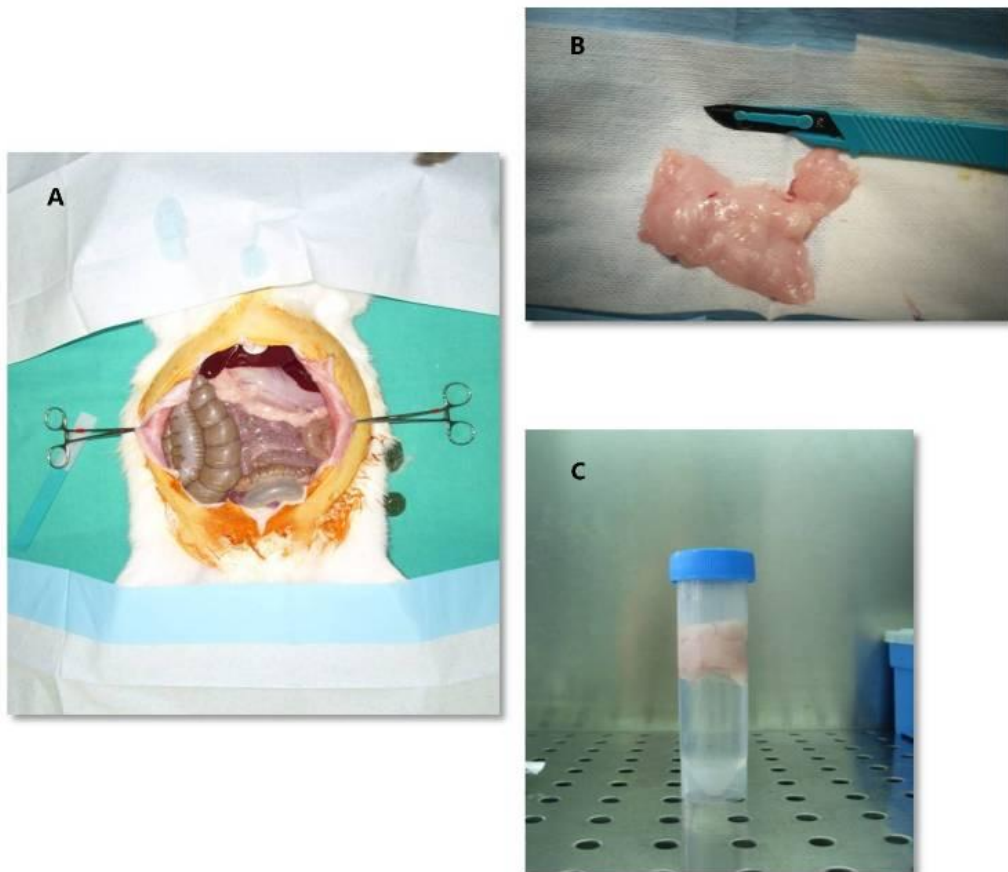
2.1.1. Aislamiento de las las células troncales mesenquimales de tejido adiposo

Se utilizó la grasa de epiplón de hembras de conejo. Se hizo una digestión mecánica de la misma lavándola, previamente, con solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 (PBS) para quitar los restos de eritrocitos que pudieran quedar. Se retiró el PBS y se añadió collagenasa al 0,075% durante una hora a 37°C y en agitación continua, previamente activada a 37 °C durante media hora [37].

- *Extracción de grasa de epiplón de conejo*

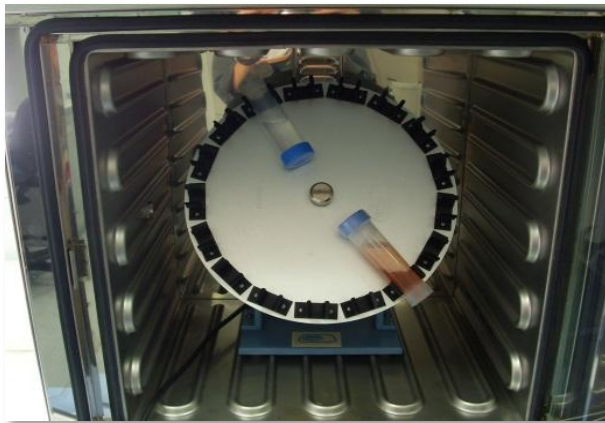
Figura 6. Extracción de grasa del epiplón de conejo.

A. Laparotomía. **B.** Grasa de epiplón. **C:** Lavado de la grasa.



Para inactivar la colagenasa, se añadió un volumen de medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM) con 10% de suero fetal bovino (SFB), se centrifugó a 300 xg, eliminando posteriormente tanto el sobrenadante como los restos de grasa, dejando únicamente el precipitado (fracción vascular estromal) que se resuspendió en 5 ml de DMEM con 10% de SFB.

Figura 7. Centrifugado de la grasa y obtención de la fracción vascular estromal.



▪ *Fase intermedia previa a la siembra*

La fracción vasculoestromal resuspendida se añadió sobre 5 ml de Ficoll. Se centrifugó durante 35 minutos a 300 xg, recogiendo posteriormente únicamente la fase intermedia, la cual se lavó tres veces con DMEM y 10% de SFB y se sembró en una placa de cultivos de 60 mm de diámetro con DMEM, conteniendo 1g/l de glucosa y Glutamax®, 10% de SFB y penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (100 µg/ml) a 37 °C con un 5% de CO₂, cambiando el medio de cultivo cada 3-4 días.

2.1.2. Caracterización de las células troncales mesenquimales de tejido adiposo

En el año 2006, el Comité de Células Madre Mesenquimales de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció una serie de criterios para caracterizar estas células:

- a. Deben ser células que se adhieran en una superficie plástica.
- b. Deben producir unidades formadoras de colonias con aspecto fibroblástico (CFU-F).
- c. Deben expresar determinados marcadores de superficies como el CD73, CD90, CD105 y carecer de CD11b, CD45 y HLA-DR, principalmente.
- d. Deben tener la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos.

2.1.2.1. Adhesión superficie plástica

Se comprueba la adhesión celular a la superficie de cultivo con microscopio óptico invertido.

2.1.2.2. Unidades formadoras de colonias de aspecto fibroblástico (CFU-F)

Se sembraron 100 células en una placa de 100 mm de diámetro con medio de mantenimiento (DMEM con 10% SFB) durante 15 días, cambiando cada 3-4 días el medio de cultivo. Al cabo de los 15 días, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0,1% en agua destilada.

2.1.2.3. Marcadores de superficie

Otra de las maneras internacionalmente establecidas para caracterizar las ADSCh es mediante citometría de flujo para marcadores de superficie [26, 53]. Como marcadores positivos se utilizaron CD73, CD90 y CD105 y como negativos CD11b, CD45 y HLA-DR, usando para cada uno de ellos su isotipo control que nos refleja la fluorescencia inespecífica (**Tabla 1**).

Tabla 1. Marcadores de superficie.

Anticuerpo	Fluoróforo	Clon	Isotipo	Referencia
CD73	PE	AD2	Mouse IgG1 κ	BD Pharmingen 550257
CD90	APC	5E10	Mouse IgG1 κ	BD Pharmingen 559869
CD105	PE	43A4E1	Mouse IgG1	Miltenyi 130-094-941
CD11b	APC	M1/70.15.11.5	Rat IgG2b	Miltenyi 130-091-241
CD45	FITC	5B1	Mouse IgG2a	Miltenyi 130-080-202
HLA-DR	PE	TU36	Mouse IgG2b κ	BD Pharmingen 555561

Entre 100.000 y 200.000 células en un volumen de 100 µl de PBS se incubaron con 5-10 µl de anticuerpo, a 4°C durante 20 minutos y en oscuridad. Posteriormente se hizo un lavado con PBS para eliminar el anticuerpo no unido y se resuspendieron en un volumen final de 400 µl de PBS.

Una vez encontrada la población de interés, según su tamaño y complejidad, se estudiaron 10.000 eventos con un citómetro *Navios* (Beckman Coulter Brea, CA, USA) y los datos fueron analizados con el programa *CellQuest Pro* (BD).

2.1.2.4. Diferenciación osteogénica

El estudio de la diferenciación osteogénica de las ADSCs *in vitro* se realizó mediante el estudio de la mineralización de la matriz extracelular (tinción con Rojo Alizarina), actividad fosfatasa alcalina (hidrólisis de p-N-fenilfosfato en *buffer* de dietanolamina) y expresión de osteocalcina (ELISA, Invitrogen). Se sembraron 3.000 células/cm² en una placa de 12 pocillos. Se dejaron una semana a 37 °C y 5% de CO₂ con medio de mantenimiento. A la semana se pasó a medio de diferenciación (*StemPro Osteogenesis Differentiation Kit*; Invitrogen) durante 4 semanas, cambiándolo cada 3-4 días.

- *Mineralización de matriz extracelular*

Se preparó una solución de Rojo Alizarina al 1% en dH₂O, se filtró por un filtro de 0,45 µm y se ajustó el pH a 4,2 con NH₃, guardándose a temperatura ambiente y en oscuridad. Se fijaron las células, después de 4 semanas de cultivo, con PFA al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió el colorante durante 20 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Se observó al microscopio para su posterior valoración y se realizaron fotos, demostrando la mineralización.

- *Actividad de fosfatasa alcalina*

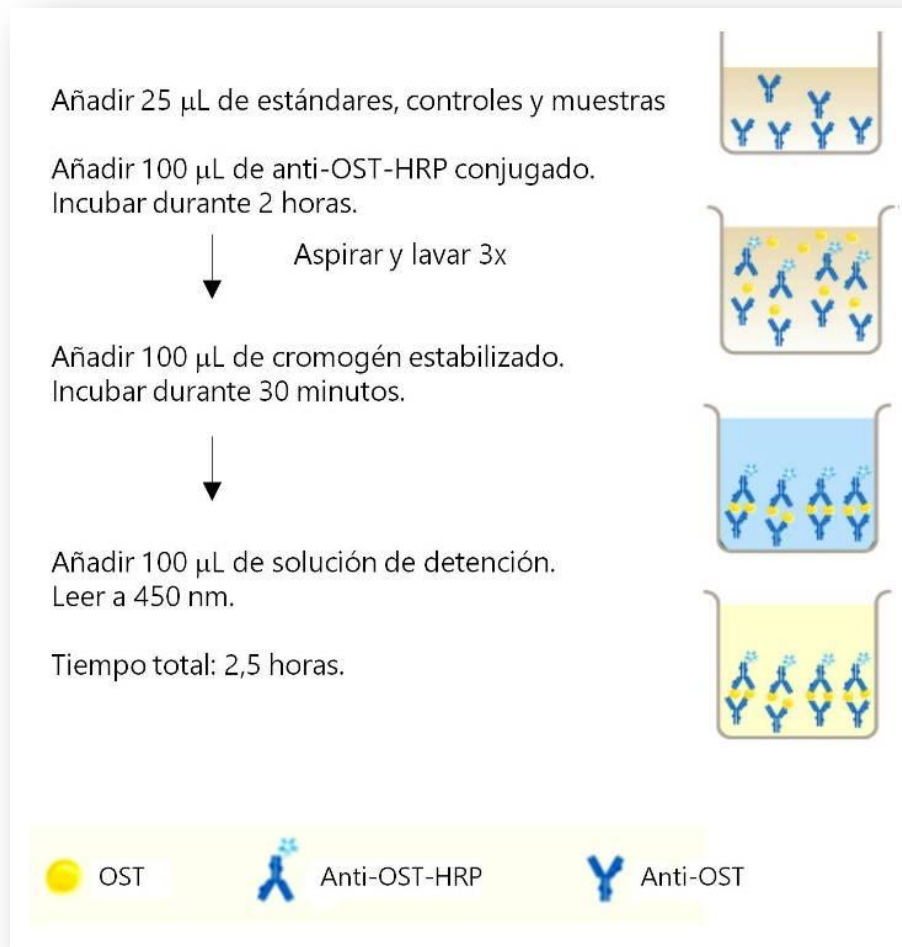
La valoración de la actividad de fosfatasa alcalina se realizó por colorimetría, basada en la hidrólisis del parnitrofenilfosfato (pNpp) en parnitrofenol (pNpol) catalizada por la fosfatasa alcalina. La reacción se realizó en un tampón de dietanolamina (Sigma) 1 M, MgCl₂ 0,5 mM (Sigma) y 1,85 mg/ml pNpp (Sigma) a pH 9,8 durante 1 hora a 37 °C. Se incluyó una curva patrón de pNpol, desde 30 a 1,25 nmoles, midiendo la absorbencia a 405 nm. Se realizaron 6 mediciones por cada corte temporal: 7, 14, 21 y 28 días.

- *Expresión de osteocalcina*

La osteocalcina es la principal proteína no colágena de la matriz ósea. Tiene un peso molecular de 5.800 Da y contiene 49 aminoácidos, incluyendo tres residuos de ácido gamma carboxiglutámico. La osteocalcina es sintetizada por los osteoblastos.

La expresión de osteocalcina en los cultivos fue valorada por el método ELISA utilizando el *kit* comercial de Invitrogen. Este experimento utiliza dos anticuerpos monoclonales dirigidos frente a epítopos de la osteocalcina humana. La cuantificación se realiza por colorimetría, midiendo la absorbencia que será proporcional a la cantidad de osteocalcina humana.

Figura 8. Método ELISA para la detección de osteocalcina.



2.2. Cultivo en Triosite[®] y métodos de valoración de biocompatibilidad y diferenciación a línea osteogénica

Para la vehiculización de las células en el defecto óseo utilizamos fosfato tricálcico comercial (Triosite[®]). El Triosite[®] consiste en bloques de una cerámica porosa de hidroxiapatita (el 60%) y beta fosfato tricálcico (el 40%). La porosidad del material combina macroporos de 300 a 600 μm y microporos de menos de 10 μm para facilitar la osteoconducción, manufacturado por Zimmer (Warsaw, Indiana).

Figura 9. Gránulos de Triosite®.



Los gránulos de Triosite® se incubaron a 37°C con ADSCh a una cantidad de 50.000 células/mg de Triosite®, en agitación suave y en placas de cultivo de baja adhesividad, durante 4 semanas, y en medio osteogénico de diferenciación (*StemPro*, Invitrogen). Se valoraron los siguientes parámetros:

- *Adhesión celular al Triosite®*: tinción con hematoxilina-eosina, para lo cual se mantuvo en cultivo durante 3 horas, 1 y 3 días, fijado en formalina durante 3 días a 4°C, decalcificado durante 2 días con EDTA 10% y procesado para inclusión en parafina realizando cortes de 5 μm . También se realizaron microfotografías de contraste de fase.
- *Diferenciación osteogénica*: estudio de la mineralización (tinción con Rojo Alizarina), actividad fosfatasa alcalina (hidrólisis de p-N-fenilfosfato en *buffer* de dietanolamina) y expresión de osteocalcina (ELISA, Invitrogen).

Para su utilización como vehículo para las ADSCh, los gránulos se incubaron en medio de cultivo a 2×10^6 células/ml durante 3 h previo a su implantación a 37°C. Tras la incubación y adhesión celular a la cerámica, el número de células aportado por gramo de Triosite® era de 50.000 células por mg de Triosite®, aportando 50-60 mg de la cerámica en cada tratamiento, por tanto $2,5\text{-}3 \times 10^6$ ADSCh por tratamiento.

2.3. Modelo animal de defecto óseo: técnica quirúrgica y vehiculización de las células

Todas las actuaciones realizadas contaron con la aprobación del Comité Ético de Bienestar Animal (CEBA) del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

Se incluyeron en el estudio 32 animales: 7 para la definición del modelo, 10 para el estudio de la historia natural de la lesión y 15 animales para el ensayo. Utilizamos como *modelo* animal a conejos hembra adultos Blanco New Zealand ($4.300 \text{ kg} \pm 0,250 \text{ kg}$). Los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia general. Se realizó la inducción con Ketamina/Xylacina a dosis 25/5 mg/kg. Se realizó la intubación con tubo de 3-3,5 con balón y ventilación espontánea o asistida en función de la respuesta del animal. Se realizó el mantenimiento inhalatorio con isoflurano al 1,5%. Se pautó, asimismo, Tramadol[®] a una dosis de 10 mg/kg.

Técnica quirúrgica: se prepara el campo con Betadine[®], sin realizar rasurado, y pañeado estéril. Por palpación, se localiza en el tercio proximal del húmero en su cara lateral, realizando una incisión longitudinal sobre el mismo de 2 cm. Por disección roma y a través del músculo deltoides, alcanzamos la superficie lateral del húmero proximal. Aproximadamente a 3 cm del borde proximal del mismo, realizamos un defecto monocortical con broca de 3,5 mm. A continuación, se realiza un lavado con suero fisiológico y se rellena el defecto con 60 mg de Triosite[®] en gránulos. Luego se aproximan los bordes musculares con sutura reabsorbible de 3/0 y, finalmente, se sutura la piel con sutura reabsorbible de 2/0. Se administra Betadine[®] sobre la herida quirúrgica. Este procedimiento se realizó en ambos húmeros e implantando Triosite[®] en la misma cantidad en ambos con la siguiente diferencia:

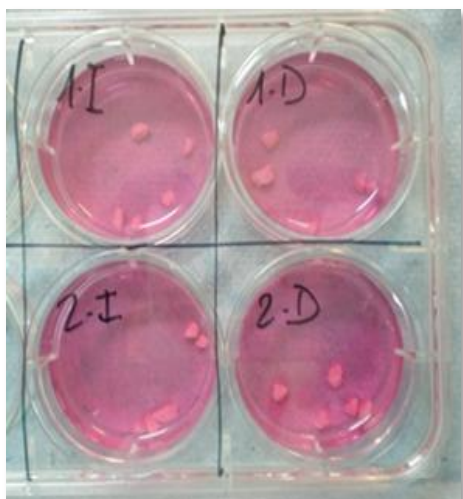
Húmero derecho: tratamiento con Triosite[®] + ADSh.

Húmero izquierdo: tratamiento con Triosite[®].

Figura 10. Lesión monocortical de 3,5 mm en el húmero proximal en su cara lateral.



Figura 11. Gránulos de Triosite[®] preparados y su implantación.



En el postoperatorio los conejos permanecían estabulados en jaulas individuales. Se administró antibiótico preoperatoriamente y durante 3 días tras la cirugía (enrofloxacina 5-10 mg/kg). Asimismo, se administraron analgésicos durante las primeras 48 h (Tramadol[®]). Se realizó una valoración diaria del estado de los animales por parte del investigador y del veterinario del animalario. La dieta fue la habitual con pienso, añadiendo heno para facilitar el tránsito intestinal. El sacrificio se realizó por eutanasia farmacológica. Los animales se sacrificaron a las 4 semanas para el ensayo terapéutico; y a las 6, 4, 2 y 1 semanas después de la cirugía para el desarrollo previo del modelo animal.

Tras el sacrificio se extrajeron los húmeros, se extirparon las partes blandas y se prepararon para el estudio histológico. En los especímenes utilizados para el desarrollo del modelo se realizaron estudios de radiología simple para verificar la correcta realización de la lesión, la no aparición de fracturas y la correcta aplicación de Triosite[®].

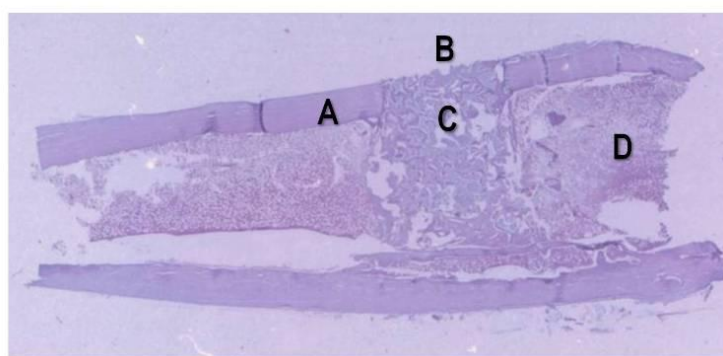
Figura 12. RX de los húmeros: lesión unicortical (rojo), relleno con Triosite® (amarillo).



2.4. Valoración histológica e histomorfométrica

Tras su obtención, las muestras se fijaron durante 72 horas en formalina al 10%. A continuación se inició el proceso de decalcificación, para lo cual las muestras se incluyeron en Osteodec (EDTA bisódico en *buffer* ácido, Bio-Optica Milano) durante 5 semanas a temperatura ambiente. Una vez comprobada la completa decalcificación de las muestras se incluyeron en parafina para, posteriormente, seccionar los húmeros de forma longitudinal sobre la lesión y se realizó tinción con Hematoxilina y Eosina, y con Tricrómico de Masson. Se realizaron cortes con micrótomos (Leica RM2255) con un grosor de 5 μm , efectuando en total 4 cortes por muestra. Para su visualización se utilizó un microscopio Carl Zeiss GmbH (Jena, Germany) y se realizaron de 3 a 6 fotografías digitales a 10 aumentos de cada espécimen, buscando aquellas zonas en las que existía mayor cantidad de Triosite®. La visualización y la realización de las fotos se llevó a cabo sin conocer de qué espécimen se trataba en cuanto a su tratamiento.

Figura 13. Microfotografía de espécimen cortado de forma longitudinal sobre la lesión a 10X.



A: cortical diafisaria.

B: lesión unicortical.

C: Triosite® relleno el defecto.

D: médula ósea.

Para el estudio histomorfométrico utilizamos el programa informático IMAGE J. Este *software* ha sido desarrollado por el *National Institute of Health* (NIH), siendo de uso público. Se trata de un sistema de análisis de imagen, y soporta gran número de formatos digitales: tiff, gif, jpeg, jpg, bmp, dicom, fits, así como imágenes en crudo (raw). Está disponible para los siguientes sistemas operativos: Windows, Mac OS, Mac OS X y Linux. Nos permite el cálculo de áreas y píxeles a partir de la selección realizada por el usuario, calcula distancias y ángulos, y facilita la creación de histogramas de densidad y gráficas lineales. También hace posible la manipulación de las imágenes para resaltar las características principales del estudio. El autor de este programa, Wayne Rasband (wayne@codon.nih.gov), es un investigador del *Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA*.

2.5. Estudio estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS para Windows 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se calcularon las medias y las desviaciones estándar. El efecto del tratamiento en las variables histológicas, por la diferencia entre el lado tratado y el no tratado, se ha estimado mediante un modelo de regresión de efectos mixtos para controlar la correlación entre las medidas repetidas en el mismo sujeto. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

3. CAPÍTULO 3 RESULTADOS

3.1. Aislamiento y cultivo de las células troncales derivadas de tejido adiposo

3.1.1. Células procedentes de epiplón de conejo

A continuación, se presentan imágenes a las 24 horas de su siembra inicial, antes de lavar la placa para retirar todas las células no adheridas y tras el cambio de medio en el que aún quedan algunas no adheridas, y se observan las adheridas.

Figura 14. A. Siembra inicial. B. Primer lavado.

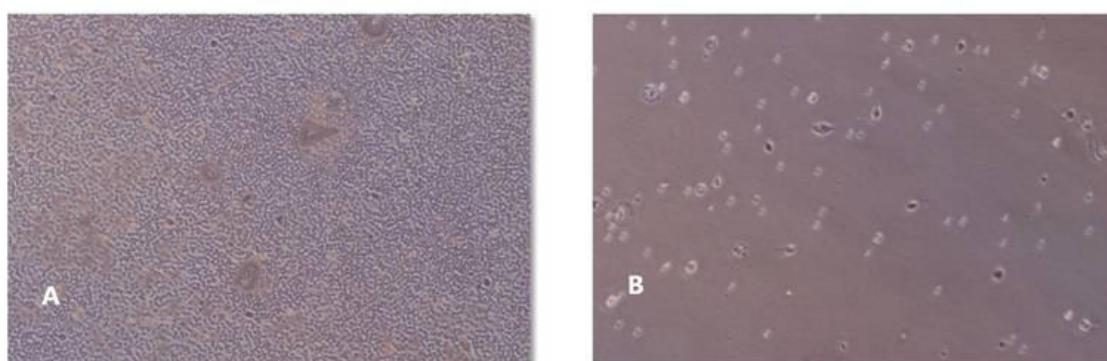
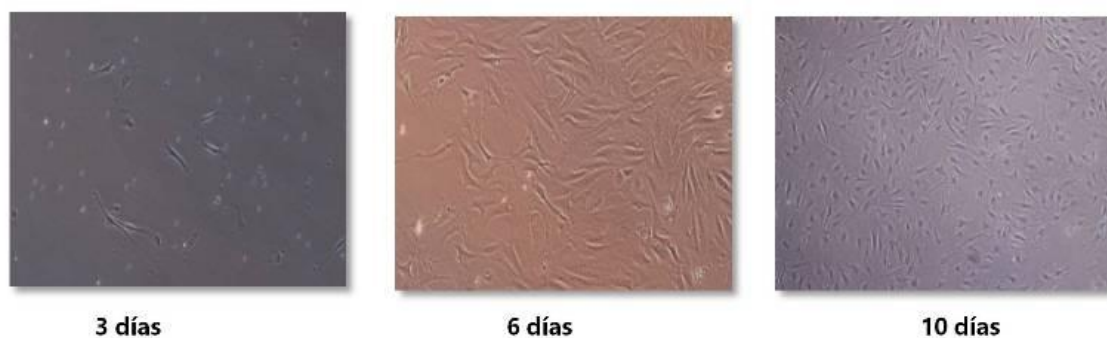


Figura 15. Imágenes a los 3 días, a los 6 días y a los 10 días de la siembra.



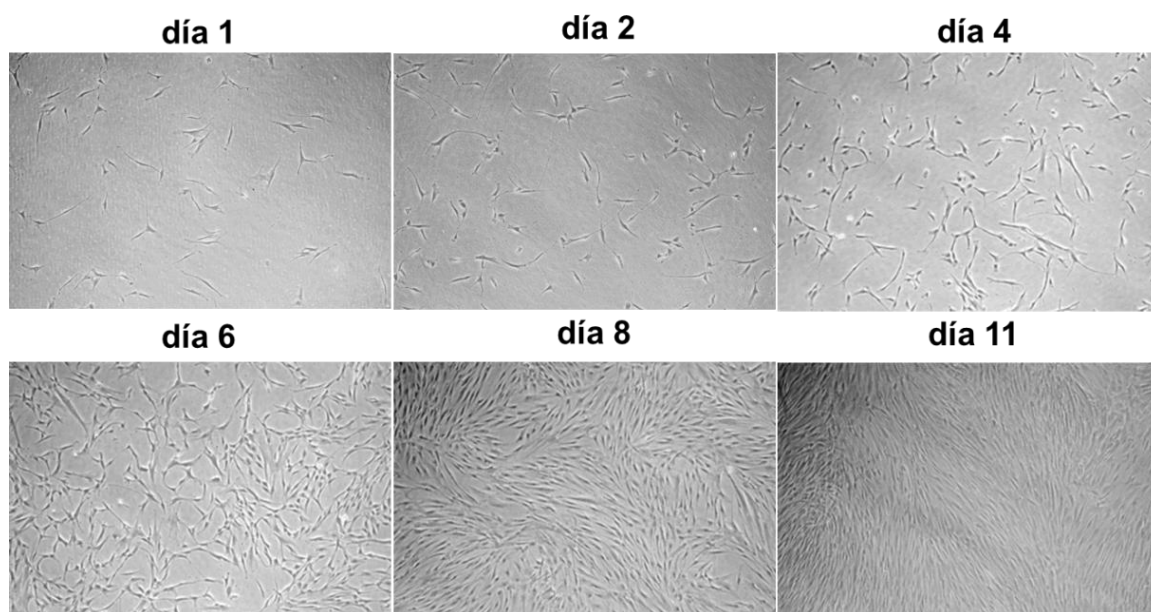
Las células aisladas de tejido adiposo de epiplón de conejo presentaban adhesión a la superficie plástica y su morfología era fibroblástica, que corresponde a la de las células mesenquimales pluripotenciales. Nos propusimos entonces caracterizar estas células estudiando los marcadores de superficie por citometría de flujo.

Las dificultades encontradas a la hora de caracterizar adecuadamente estas células, al no existir *kit* comerciales específicos para células de conejo y, por tanto, no poder asegurar que estábamos trabajando con verdaderas ADSC, nos hizo replantearnos la obtención de las células. La revisión de la literatura al respecto nos mostró que numerosos estudios en experimentación animal estaban siendo realizados con células humanas, que sí pueden ser fácilmente caracterizadas dada la estandarización y disponibilidad de marcadores comerciales. Así decidimos utilizar células humanas del Banco Nacional de Células Somáticas (Inbiobank).

3.1.2. Células procedentes de grasa abdominal humana

Se utilizaron para el estudio células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (ADSCh) (Inbiobank) que fueron cultivadas en DMEM, 1 g/l de glucosa, 10% de suero fetal bovino y antibióticos, realizando subcultivos semanales hasta un máximo de 30 duplicaciones desde la siembra inicial.

Figura 16. Imágenes del cultivo de ADSCh a 1.000 células/cm², a 1, 2, 4, 6, 8 y 11 días.



Se realizó un estudio de Duplicaciones de Población Acumuladas (CPD). Este dato nos indica el tiempo acumulado que las ADSCh del estudio se pueden mantener en cultivo sin que cambien sus características de crecimiento. Con ello conocemos el número de veces que se pueden subcultivar manteniendo la homogeneidad, lo que permite la realización de experimentos comparables.

En Terapia Celular, el conocimiento de la CPD es fundamental y una exigencia de seguridad de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Sabemos que a partir de las 50 duplicaciones (límite de Hayflick), las células en cultivo alcanzan la senescencia y es cuando son más susceptibles de sufrir alteraciones génicas. En la actualidad la AEMPS no recomienda el uso de células con más de 30 duplicaciones acumuladas en terapia humana. En nuestro estudio, sembramos 1.000 células/cm², obteniendo a la semana 25.000 células/cm², lo que supone aproximadamente 4,5 duplicaciones. El cultivo fue estable hasta la 7ª semana, 30 duplicaciones en total, a partir de la cual se producía un enlentecimiento del crecimiento celular.

A continuación, se presentan los experimentos realizados y la curva de duplicaciones acumuladas.

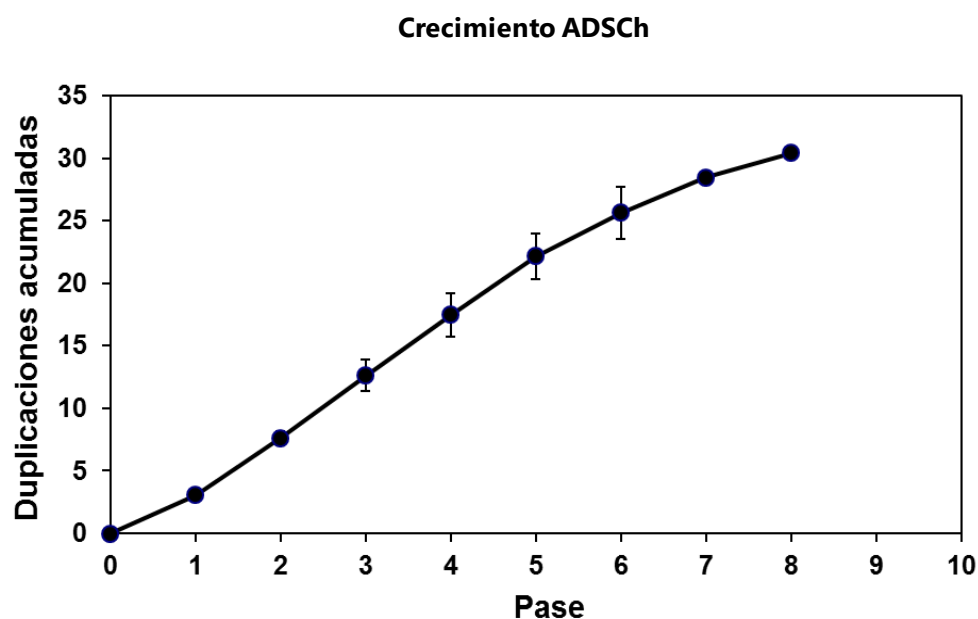
Tabla 2. Experimentos realizados.

(Véase **Figura 17**. Curva de duplicaciones acumuladas).

Pase	Lectura 1	CPD	Lectura 2	CPD	Lectura 3	CPD	Lectura 4	CPD	Media CPD	
0									0	
1	3,17	3,17	2,82	2,82	3,15	3,15	3,14	3,14	3,07	0,17
2	4,47	7,63	4,66	7,48	4,41	7,56	4,7	7,84	7,63	0,15
3	5,28	12,91	4,71	12,19	4,53	12,09	5,41	13,25	12,61	0,56
4	4,90	17,82	4,48	16,67	4,24	16,33	5,84	19,09	17,48	1,25
5	5,35	23,17	4,07	20,74	4,33	20,66	5,06	24,14	22,18	1,75
6	3,26	26,43	3,26	24,00	3,60	24,26	3,70	27,84	25,63	1,83
7			3,03	27,04	3,26	27,52	3,00	30,84	28,47	2,07
8			3,15	30,19	3,13	30,65			30,42	0,33

CPD: duplicaciones de población acumuladas.

Figura 17. Curva de duplicaciones acumuladas.



ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derviadas de tejido adiposo.

Las células utilizadas en los experimentos se obtenían entre los pases 2 y 7.

El estudio de confluencia del cultivo también fue valorado. Los resultados de los experimentos se presentan a continuación.

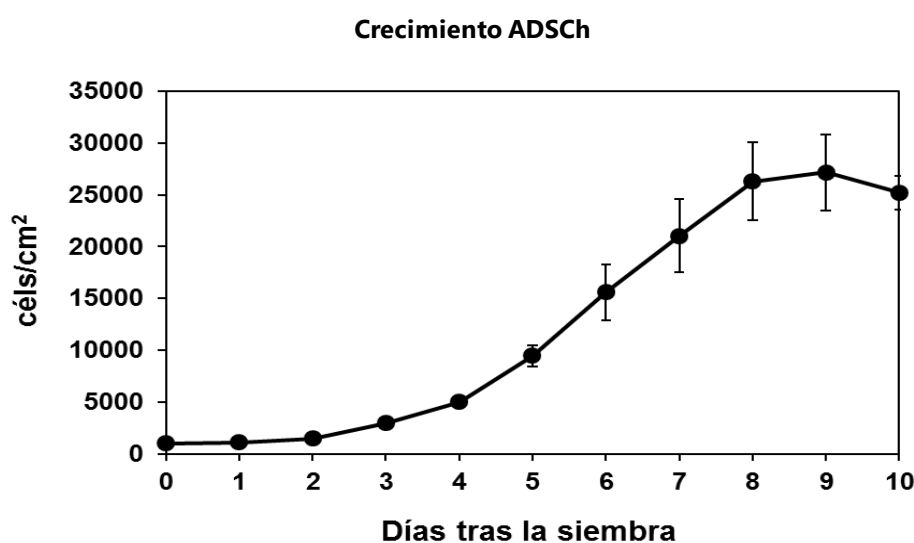
Tabla 3. Resultados de los experimentos. Valoración del estudio de confluencia del cultivo.

(Véase **Figura 20.** Curva de duplicaciones acumuladas).

Días	Cél/cm ²	DE
0	1.000	
1	1.100	
2	1.471	79
3	2.929	73
4	5.000	500
5	9.450	1.000
6	15.576	2.695
7	21.046	3.492
8	26.296	3.758
9	27.150	3.673
10	25.200	1.624

DE: desviación estándar.

Figura 18. Estudio de confluencia del cultivo.



ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo.

Las células utilizadas para los experimentos eran siempre del día 7-8 de cultivo.

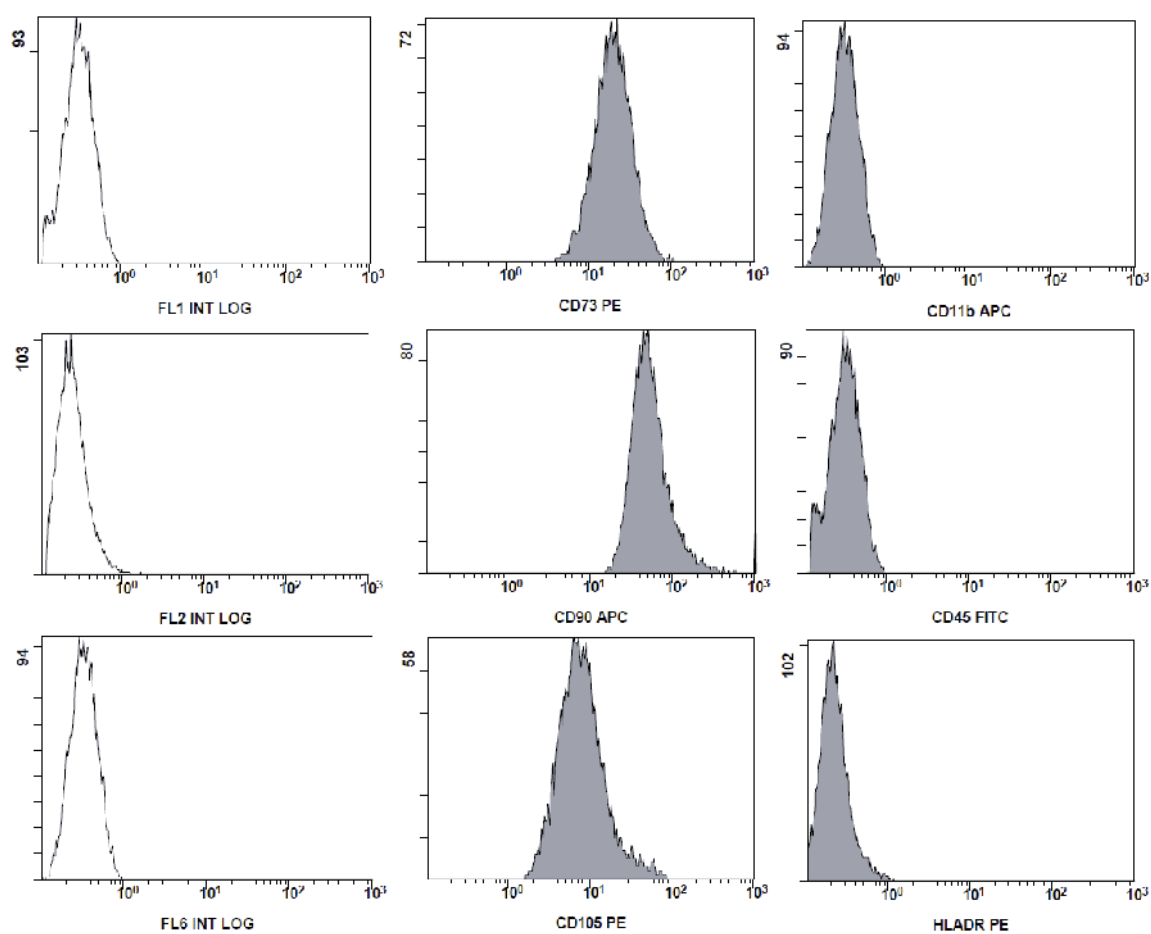
3.2. Caracterización de las células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo

3.2.1. Marcadores de superficie

Los histogramas en blanco corresponden a la fluorescencia basal en cada canal de fluorescencia analizado. El desplazamiento del histograma hacia la derecha supone la presencia del marcador correspondiente. Si corresponde con el basal, el marcador es negativo.

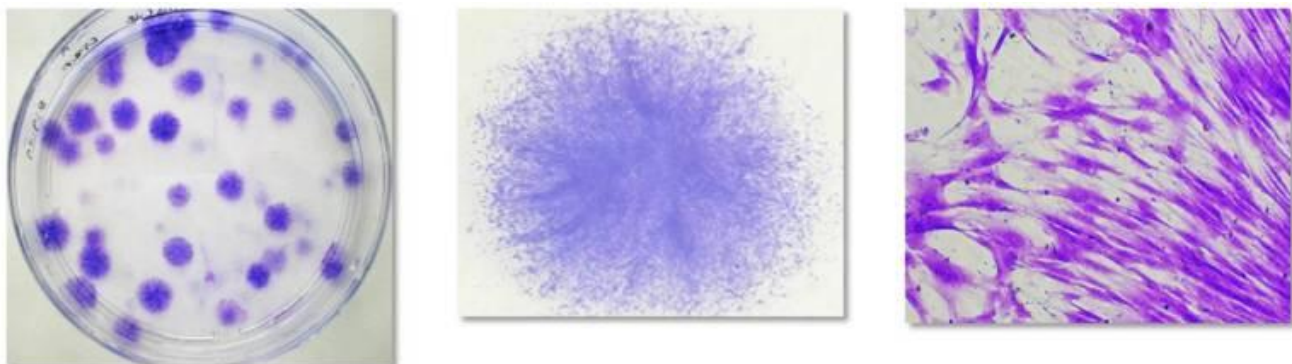
En la columna central, los marcadores positivos para ADSC son CD73, CD90 y CD105, siendo negativos para CD11b (marcador de monocito), CD45 (marcador para células de origen hematológico) y HLA-DR (antígeno mayor de histocompatibilidad tipo DR que presentan las células inmunogénicas, este marcador se positiviza con la diferenciación de las células troncales mesenquimales). El perfil presentado según los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, del inglés: *International Society of Cellular Therapy*) es el de células troncales mesenquimales pluripotentes.

Figura 19. Citometría ADSch IB.



3.2.2. Unidades formadoras de colonias

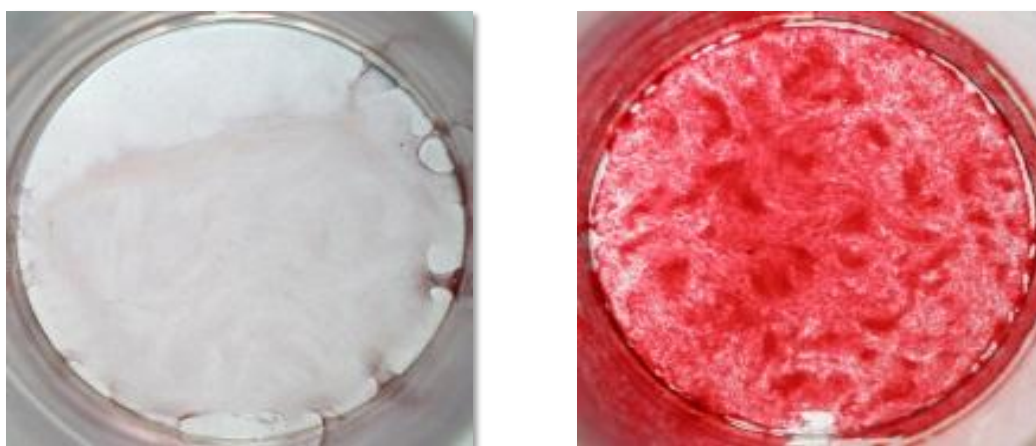
Figura 20. En nuestros cultivos, las células forman colonias de más de 50 células y mantienen un aspecto fibroblástico.



3.2.3. Diferenciación osteogénica

3.2.3.1. Mineralización de la matriz extracelular

Figura 21. Las ADSCh mineralizan la matriz extracelular al cultivarlas con medio de diferenciación osteogénica durante 21-28 días (*derecha*) frente al medio de proliferación (*izquierda*), tinción realizada con Rojo Alizarina.



ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo.

En nuestro estudio se ha realizado únicamente la diferenciación osteogénica, al ser el objeto de nuestro trabajo. La diferenciación a las líneas adipogénica y condrogénica han sido testadas por el laboratorio de origen.

3.2.3.2. Actividad de la fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina es una enzima glicoproteica presente en la membrana celular y tras su clivaje se encuentra en la matriz mineralizada. Su función no está totalmente aclarada, aunque hoy podemos afirmar que interviene en la mineralización de la matriz extracelular.

A continuación se incluyen los datos obtenidos y la gráfica resumen sobre la cuantificación de la fosfatasa alcalina de los cultivos celulares en medio osteogénico (MO). Se presentan los datos de un experimento representativo, habiendo realizado cada condición por triplicado.

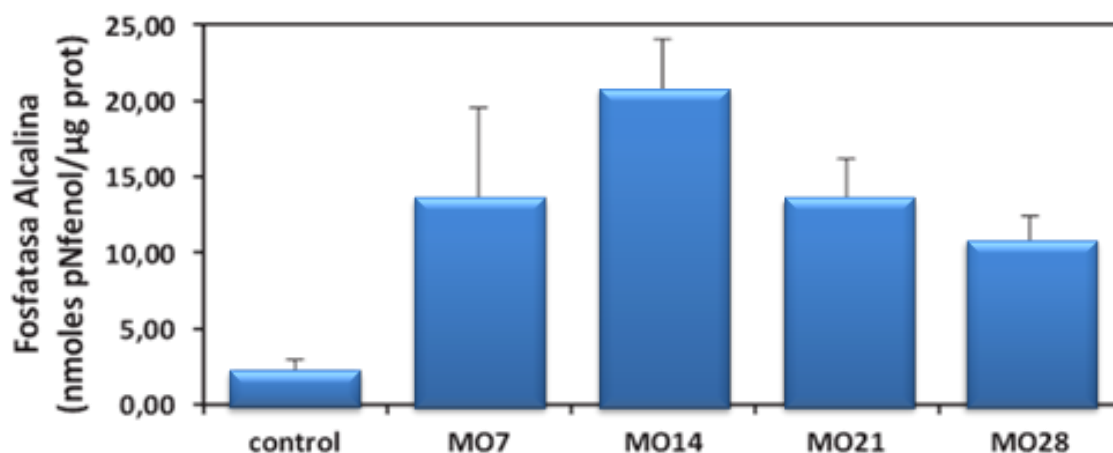
Tabla 4. Datos obtenidos sobre la cuantificación de la fosfatasa alcalina de los cultivos celulares en medio osteogénico.

	FA	Media	DE		Media	DE
Control	2,59	2,13	0,81	Control	2,13	0,81
	2,93					
	3,03			MO7	13,42	6,10
	1,18					
	1,45			MO14	20,52	3,57
	1,61					
MO7	5,92	13,42	6,10	MO21	13,35	2,83
	11,96					
	8,55			MO28	10,57	1,87
	22,14					
	18,68					
	13,25					
MO14	19,01	20,52	3,57			
	18,22					
	16,67					
	20,46					
	26,79					
	21,99					
MO21	12,82	13,35	2,83			
	13,53					
	11,35					
	17,15					
	9,44					
	15,8					
MO28	7,71	10,57	1,87			
	9,42					
	12,21					
	10,39					
	10,86					
	12,83					

DE: desviación estándar; FA: fosfatasa alcalina;
MO: medio osteogénico.

Figura 22. Cuantificación de la fosfatasa alcalina de los cultivos celulares en medio osteogénico.

ADSCh en plástico



ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derviadas de tejido adiposo; MO: medio osteogénico.

Los datos se muestran en nanomoles por microgramo de proteína. Estos datos demuestran que el comportamiento del cultivo estudiado es el mismo que el de osteoblastos en cultivo primario, presentando un máximo de detección de fosfatasa alcalina a los 14 días de cultivo.

3.2.3.3. Expresión de osteocalcina

La osteocalcina es una proteína no colágena de la matriz ósea, producida por los osteoblastos, que posee residuos de ácido glutámico dicarboxilado que le confiere la propiedad de facilitar la unión del calcio a la matriz. La osteocalcina participa en el control de la mineralización y remodelado óseo y actuaría, asimismo, en el reclutamiento de los osteoclastos.

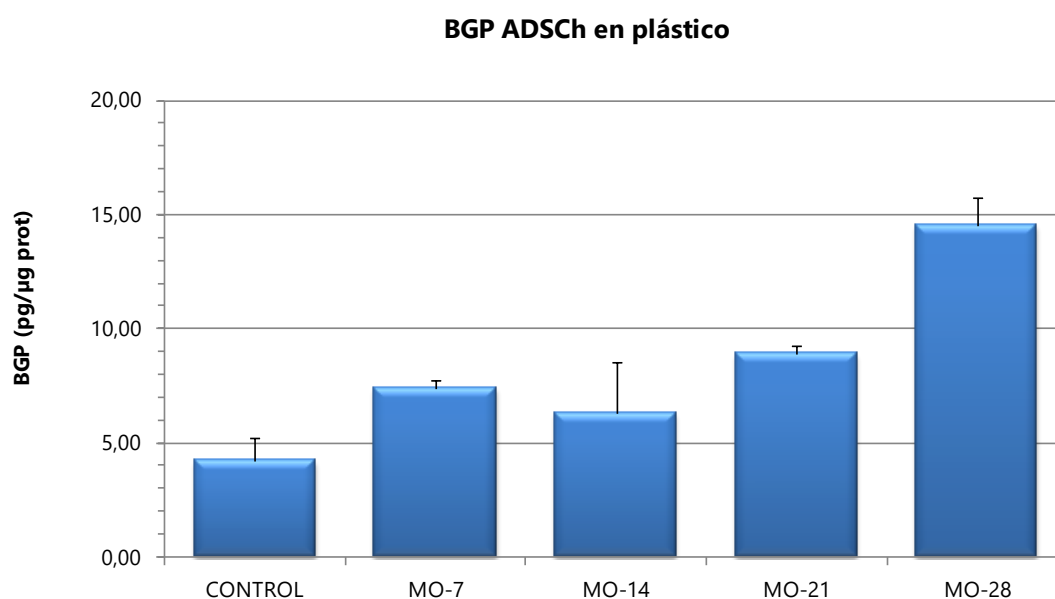
Los resultados obtenidos en la detección de osteocalcina (BGP) de las ADSCh en medio de diferenciación osteogénico cultivadas en plástico se presentan a continuación. Se muestran los datos de un experimento representativo, habiendo realizado cada condición por triplicado.

Tabla 5. Resultados obtenidos en la detección de osteocalcina de las ADSCh en medio osteogénico de diferenciación cultivadas en plástico.

	Media	DE
CONTROL	4,22	1,04
MO-7	7,41	0,36
MO-14	6,28	2,25
MO-21	8,91	0,36
MO-28	14,54	1,24

ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derviadas de tejido adiposo; DE: desviación estándar; MO: mdio osteogénico.

Figura 23. Resultados obtenidos en la detección de osteocalcina de las ADSCh en medio de diferenciación osteogénico cultivadas en plástico.



ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derviadas de tejido adiposo;
BGP: osteocalcina; MO: medio osteogénico.

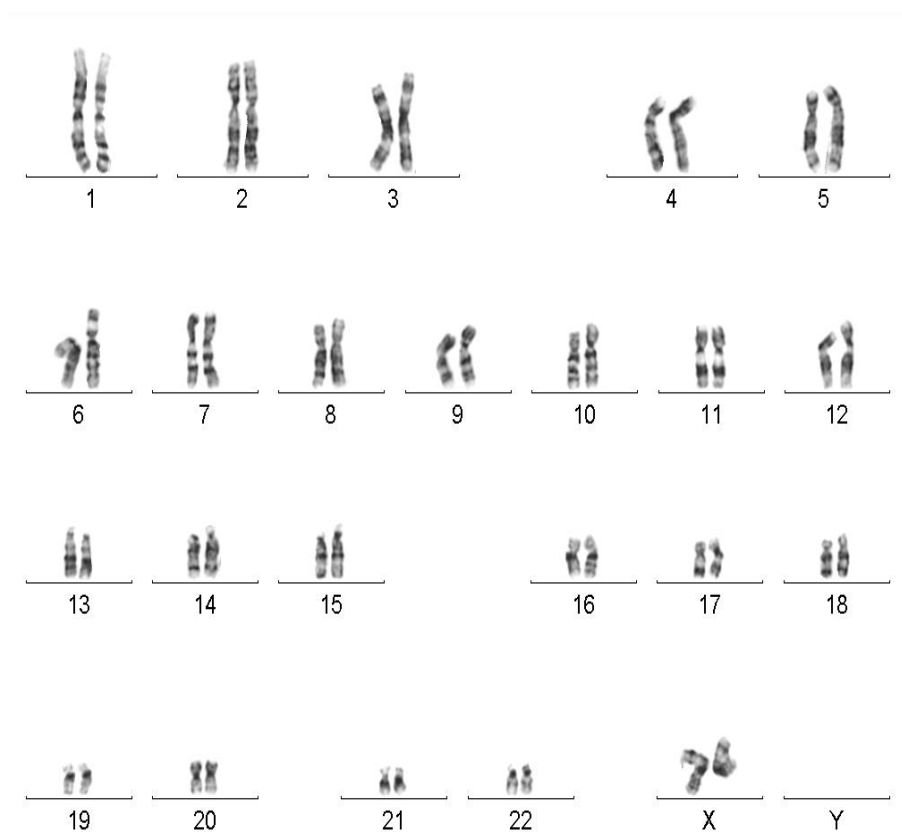
Se muestran Los niveles de osteocalcina en las muestras recogidas a los 7, 14, 21 y 28 días presentan un aumento progresivo, con el máximo al final del seguimiento (28 días), siendo este el perfil característico de la producción de osteocalcina por células osteoblásticas en cultivo. Los datos se muestran en picogramos por microgramo de proteína.

El estudio estadístico realizado por ANOVA demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores alcanzados a los 28 días, comparado con el control a los 7, 14 y 21 días.

3.3. Cariotipo

Se estudió el cariotipo de las células ADSCh utilizadas en los experimentos. Este trabajo fue realizado por el Laboratorio de Citogenética del Hospital Universitario La Paz de Madrid (Dra. Fe García Santiago y Dra. Elena Mansilla). La conclusión del estudio fue que se traba de células de cariotipo femenino sin alteraciones.

Figura 24. Estudio del cariotipo de las células ADSCh utilizadas en los experimentos. Imagen de banda G.

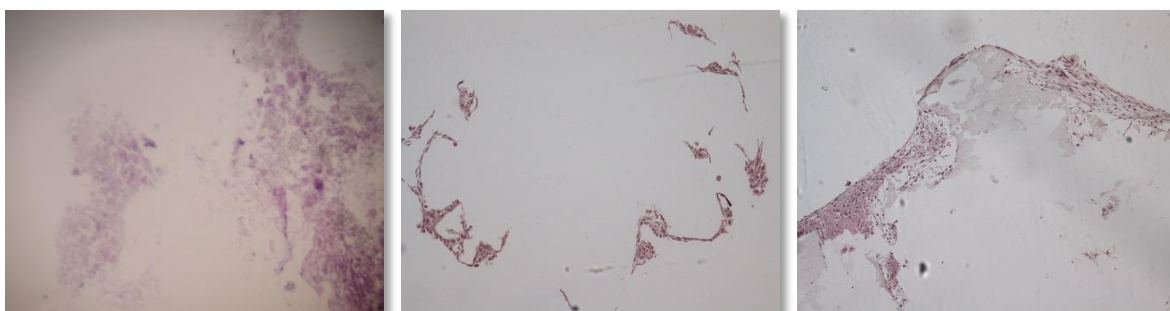


ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derviadadas de tejido adiposo.

3.4. Biocompatibilidad Triosite® – células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo

La biocompatibilidad de la cerámica con las ADSCh quedó demostrada al constatar la adhesión de dichas células en monocapa a la superficie de Triosite®, hecho que era patente a las 3 horas de su incubación. Por tinción de HE se objetivó dicha adhesión.

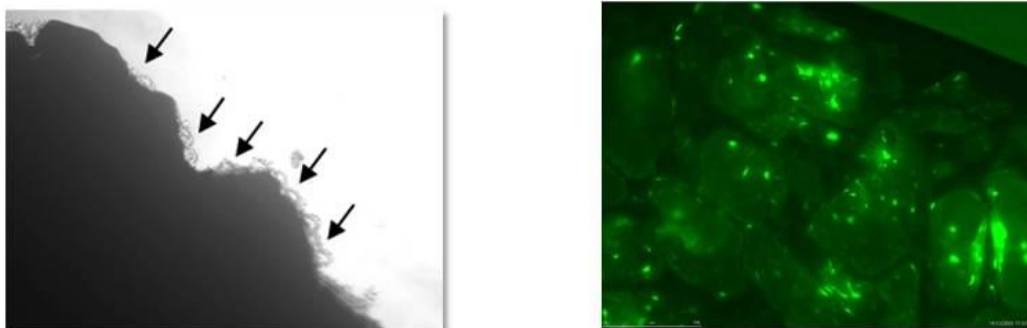
Figura 25. A la *derecha*, Triosite® en medio de cultivo sin células, y a la *izquierda* con ADSCh a las 3 horas y 2 semanas en medio de proliferación, objetivándose la adhesión celular a la superficie del biomaterial.



ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derviadas de tejido adiposo.

También se comprobó esta adhesión por medio de microfotografías de contraste de fase y por fluorescencia (células ADSCh modificadas genéticamente para expresar proteína verde fluorescente, GFP. Estas células marcadas con GFP no fueron utilizadas en el modelo animal al inducir respuesta inmune en mamíferos y pudiendo alterar los resultados de los experimentos.

Figura 26. Microfotografías de contraste de fase y por fluorescencia (células ADSCh modificadas genéticamente para expresar proteína verde fluorescente).



ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derviadas de tejido adiposo..

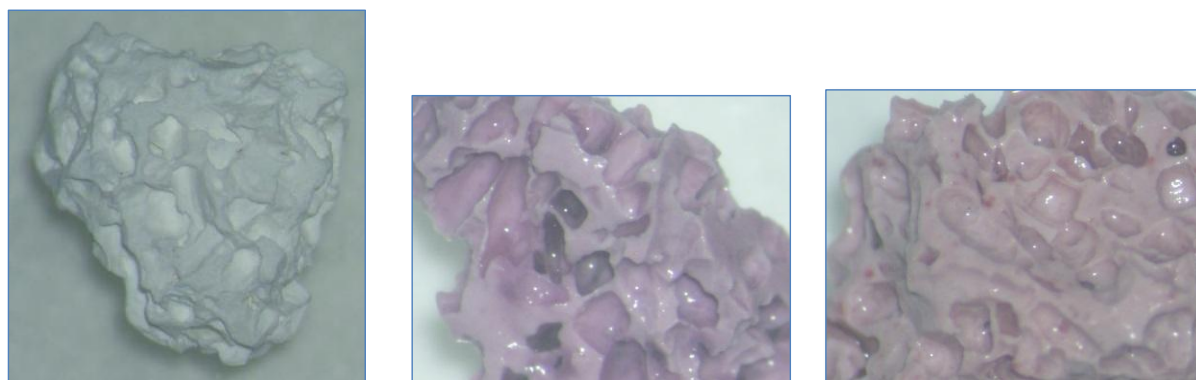
3.5. Diferenciación células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo *in vitro* en Triosite®

El estudio de la diferenciación de las ADSCh en Triosite® se realizó mediante el estudio de la mineralización (tinción con Rojo Alizarina), actividad fosfatasa alcalina (hidrólisis de p-N-fenilfosfato en *buffer* de dietanolamina) y expresión de osteocalcina (ELISA, Invitrogen).

3.5.1. Mineralización de la matriz extracelular

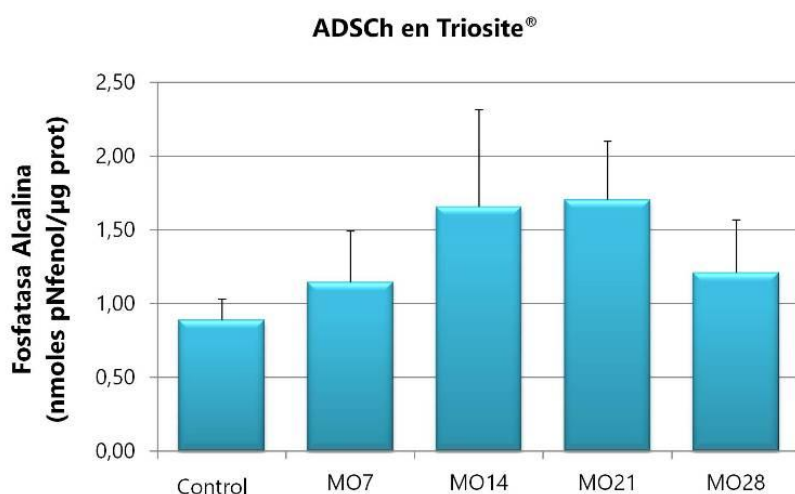
Las ADSCh mineralizan la matriz extracelular al cultivarlas con medio de diferenciación osteogénica durante 21-28 días, demostrándose este hecho por medio de la tinción con Rojo Alizarina en el cultivo con medio osteogénico, sin embargo no es posible la realización de este experimento en gránulos de Triosite® dado el contenido cálcico de la cerámica dando positivo indistintamente con o sin células ADSCh.

Figura 27. Triosite® original, con tinción Rojo de Alizarina sin ADSCh y con ADSCh.



ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derviadas de tejido adiposo.

Figura 28. ADSCh en Triosite®.



ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derviadas de tejido adiposo;
MO: medio osteogénico.

3.5.2. Actividad de la fosfatasa alcalina

Las ADSCh cultivadas con medio de diferenciación osteogénica en gránulos de Triosite[®] expresan fosfatasa alcalina, presentando una actividad máxima a las 2 semanas de iniciar la diferenciación. A continuación de muestra la tabla de resultados.

Tabla 6. Resultados de la expresión de fosfatasa alcalina de las ADSCh cultivadas en medio de diferenciación osteogénica en gránulos de Triosite[®].

	FA	Media	DE
Control	0,67	0,89	0,14
	0,91		
	0,87		
	1,06		
	0,94		
MO7	0,81	1,15	0,35
	1,50		
	1,49		
	0,8		
	1,13		
MO14	0,90	1,66	0,66
	2,71		
	1,56		
	1,45		
	1,66		
MO21	1,15	1,70	0,39
	1,42		
	1,93		
	2,02		
	2,00		
MO28	1,23	1,21	0,36
	0,79		
	1,78		
	1,16		
	1,09		

	Media	DE
Control	0,89	0,14
MO7	1,15	0,35
MO14	1,66	0,66
MO21	1,70	0,39
MO28	1,21	0,36

ADSCh: células troncales mesenquimales humanas dervidas de tejido adiposo; DE: desviación estándar; FA: fosfatasa alcalina; HOST: osteocalcina humana; MO: medio ostogénico; PROT: proteína.

Este resultado es equiparable al ya descrito de la diferenciación de ADSCh en plástico.

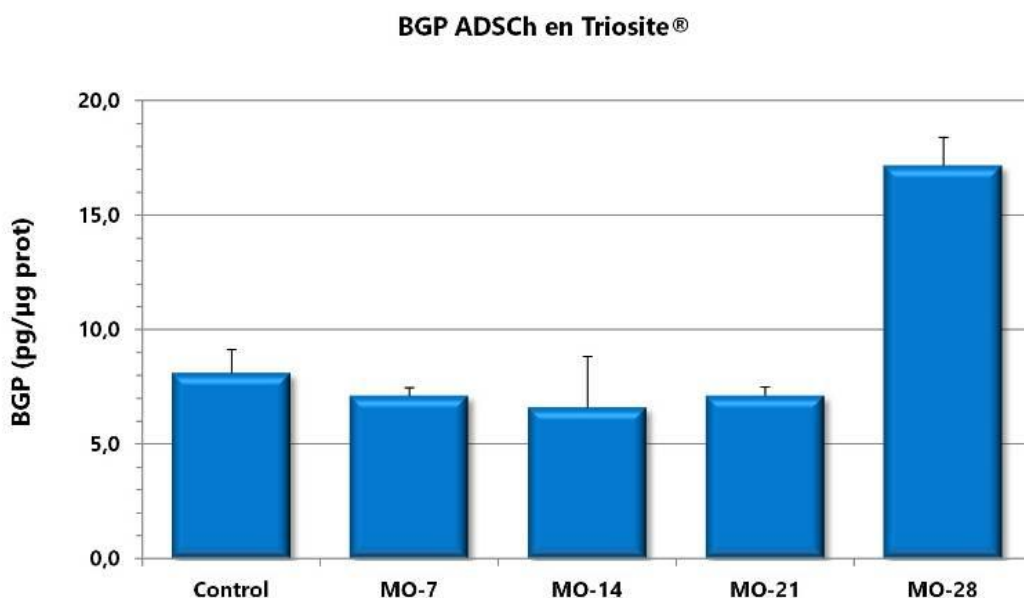
3.5.3. Expresión de osteocalcina

Los resultados obtenidos en la detección de osteocalcina (BGP) de las ADSCh en medio de diferenciación osteogénico cultivados en Triosite[®] se presentan a continuación. Se muestran los datos de un experimento representativo, realizándose cada condición por triplicado.

Los niveles de osteocalcina en las muestras recogidas a los 7, 14, 21 y 28 días presentan un valor máximo al final del seguimiento (28 días), con una diferencia estadísticamente significativa comparada con las lecturas de control y a los 7, 14, y 21 días. Este es el perfil característico de producción de osteocalcina por células osteoblásticas en cultivo. Los datos se muestran en picogramos por microgramo de proteína.

Si comparamos los resultados obtenidos al cultivar las ADSCh en medio de diferenciación osteogénico en plástico o en Triosite[®], no observamos diferencias, con lo que el comportamiento y diferenciación de estas células a la línea osteoblástica no se ve favorecida ni impedida por la presencia del fosfato tricálcico.

Figura 29. Niveles de osteocalcina en cultivo de ADSCh en Triosite[®].



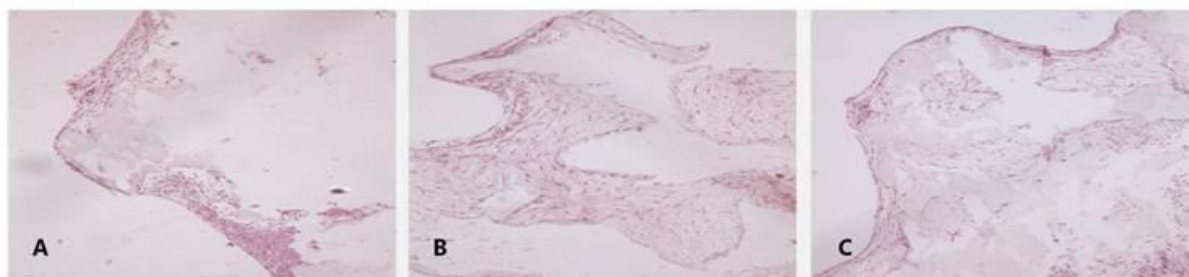
ADSCh: células troncales mesenquimales humanas dervidas de tejido adiposo; BGP: osteocalcina; MO: medio osteogénico.

Tabla 7. Resultados de la expresión de osteocalcina de las ADSCh cultivadas en medio de diferenciación osteogénica en gránulos de Triosite®.

		[HOST]/[PROT] (pg/μg)	
		Media	DE
TRIOSITE®	Control	8,1	1,5
	MO-7	7,1	0,5
	MO-14	6,6	0,6
	MO-21	7,1	0,5
	MO-28	17,2	3,9

ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo; DE: desviación estándar; HOST: osteocalcina humana; MO: medio osteogénico; PROT: proteína.

Figura 30. En las imágenes se muestran cortes histológicos con tinción de Hematosilina/Eosina del cultivo celular de ADSCh con Triosite®. **A.** Sin medio osteogénico. **B.** A los 21 días con medio osteogénico. **C.** A los 28 días con medio osteogénico. Se observa la presencia de células en contacto con la matriz de Triosite® en todas las preparaciones.



ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo.

3.6. Modelo animal y evolución clínica

Treinta y dos conejos hembra adultos Blanco New Zealand se incluyeron en el estudio: 7 para la definición del modelo, 10 para el estudio de la historia natural de la lesión y 15 animales para el ensayo (excluidos: 2 por fractura y 1 por infección).

3.6.1. Definición del modelo

Siendo nuestro objetivo la valoración de la posible repercusión de la administración de ADSCh sobre el proceso fisiológico de reparación ósea, necesitábamos un modelo que nos permitiese visualizar dicho proceso en su fase de máxima actividad, con la mayor reproducibilidad, la menor agresión y el menor número de elementos externos que pudiesen influir en este proceso.

Los modelos de defecto crítico conllevan lesiones amplias, la utilización de material de estabilización y el objetivo final es el puenteo de la lesión no pudiendo valorar los estadios intermedios. De esta forma, buscamos un modelo de lesión no crítico que cumpliese las premisas anteriores.

Con los dos primeros animales (conejo 1 y 2) estudiamos la posibilidad de producir la lesión en el fémur con una broca de 4,5 mm bicortical diafisaria, con el animal sacrificado. Valoramos la anatomía de la zona, la disección necesaria y, al realizar la lesión en el conejo 1, se produjo una fractura durante el brocado, apreciando la fragilidad del hueso del animal. En el fémur contralateral realizamos el mismo procedimiento, pero utilizando inicialmente la broca de 3,2 mm y ampliando posteriormente el defecto con la broca de 4,5 mm realizando la lesión en ambas corticales, produciéndose nuevamente la fractura del hueso. En el conejo 2 decidimos realizar la lesión unicortical comenzando con la broca de 3,2 mm y pasando a la de 4,5 mm sin aparición de complicaciones intraoperatorias.

El siguiente paso fue producir la lesión en el animal vivo bajo anestesia general. Realizamos dos ensayos (conejo 3 y 4) lesionando la cortical externa del fémur derecho con la broca de 3,2 mm, ampliando a la de 4,5 mm sin complicaciones. A los cinco días observamos impotencia funcional en el miembro posterior intervenido y crepitación a la exploración en ambos conejos. Realizamos un estudio radiológico objetivando en ambos casos una fractura diafisaria espiroidea del fémur. Los animales fueron sacrificados.

Figura 31. Control con radioscopia a la *izquierda* inmediatamente después de la realización de la lesión en el que se aprecia el orificio en diáfisis de fémur distal. A la *derecha* imagen de radioscopia tras la fractura a los 5 días.

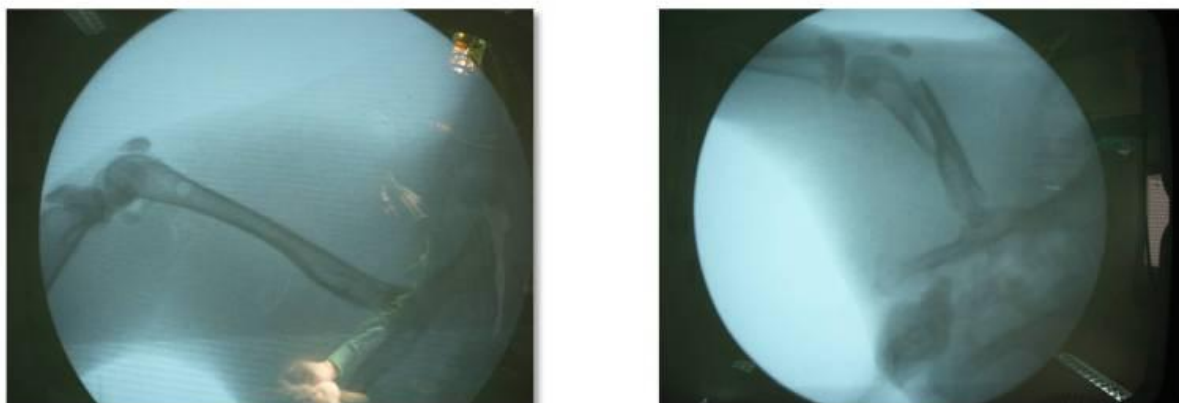


Figura 32. Imagen de la fractura tras sacrificar al animal.



Tras valoración de los casos con el veterinario del animalario, decidimos realizar la lesión en el húmero dado que las sollicitaciones mecánicas en este hueso en el conejo son mucho menores que en el fémur. Programamos dos animales (conejo 5 y 6) para realizar la lesión en el húmero derecho. El conejo 5 murió durante el proceso anestésico. El conejo 6 presentó una fractura intraoperatoria al utilizar la broca de 4,5 mm, tras la realización de la lesión inicial con la broca de 3,2 mm.

Decidimos entonces la realización de la lesión en diáfisis humeral con la broca de 3,2 mm unicortical. Se programa un nuevo conejo (conejo 7) y se realiza la cirugía en el húmero derecho sin complicaciones. Además, se rellena el defecto con Triosite[®], comprobando la factibilidad técnica de la colocación del vehículo celular. El postoperatorio transcurre sin incidencias. A las dos semanas, dada la buena tolerancia del procedimiento y de acuerdo con el veterinario, intervenimos nuevamente al conejo 7, realizando una lesión idéntica en el húmero contralateral y rellenando la lesión con Triosite[®]. A las tres semanas se realiza estudio radiológico donde se comprueba la presencia de Triosite[®] y la no existencia de complicaciones. El animal se sacrifica a las cuatro semanas de la primera intervención sin presentar complicaciones.

Figura 33. Conejo 7. Lesión unicortical bilateral en húmero proximal con Triosite[®], estudio radiológico a las 3 semanas de la primera intervención.



Tabla 8. Resumen de los resultados en la definición del modelo animal.

Animal	Procedimiento	Complicaciones
Conejo 1	Lesión bicortical de 4,5 mm en el fémur	Fractura intraoperatoria
Conejo 2	Lesión bicortical de 4,5 mm tras usar la broca de 3,2 mm en el fémur	Fractura intraoperatoria
Conejo 3	Lesión unicortical de 4,5 mm tras usar la broca de 3,2 mm en el fémur	Fractura postoperatoria
Conejo 4	Lesión unicortical de 4,5 mm tras usar la broca de 3,2 mm en e fémur	Fractura postoperatoria
Conejo 5		Complicación anestésica, muerte
Conejo 6	Lesión unicortical de 4,5 mm tras usar la broca de 3,2 mm en el húmero	Fractura intraoperatoria
Conejo 7	Lesión unicortical de 3,2 mm en el húmero bilateral	Sin complicaciones, sacrificio a las 4 semanas

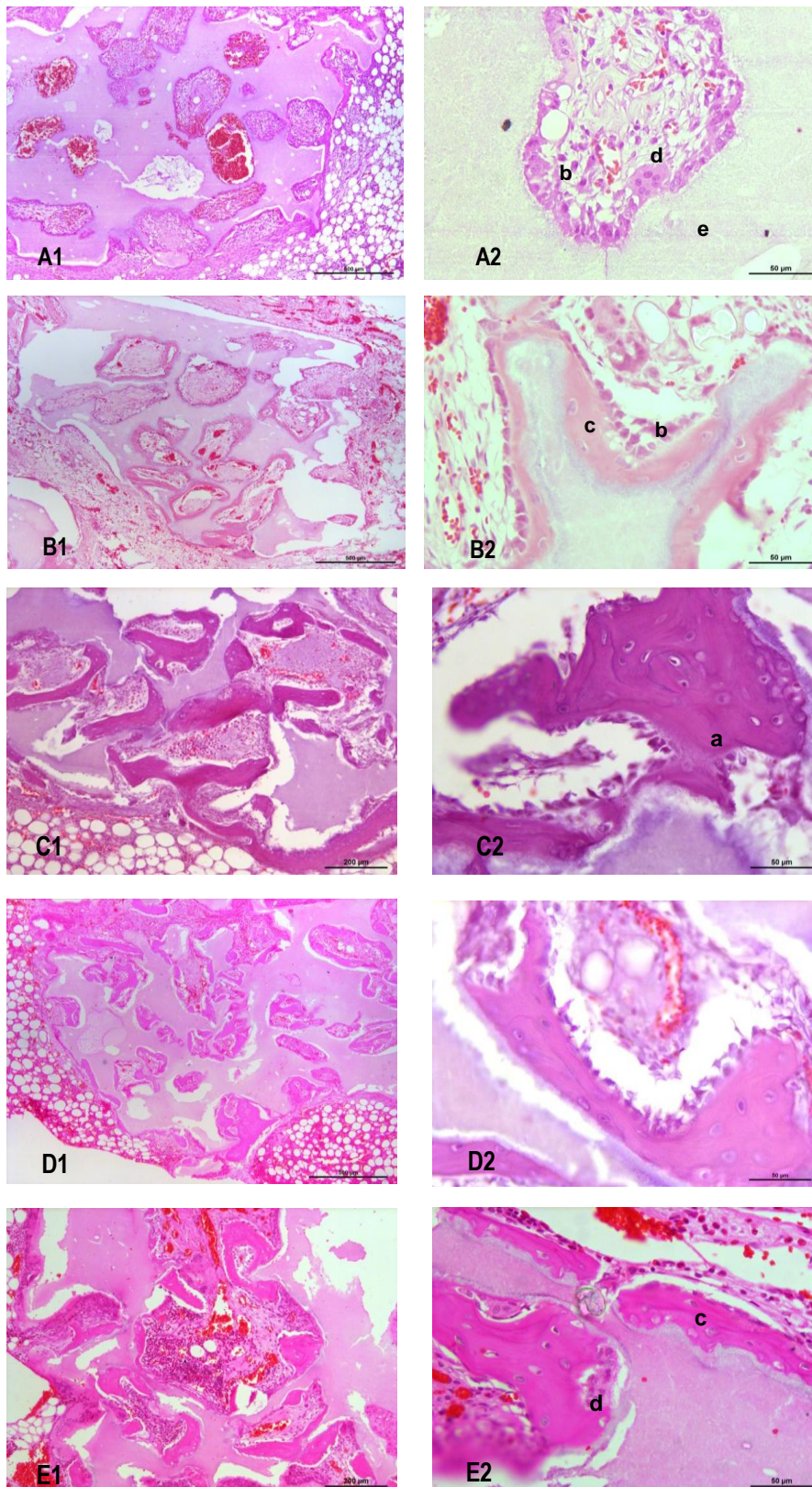
3.6.2. Historia natural de la lesión

A la hora de valorar el momento óptimo para la realización del ensayo en el desarrollo de la reparación ósea en el modelo animal, se sacrificaron animales en la primera semana (2 conejos), en la segunda semana (2 conejos), a las 4 semanas (2 conejos), a las 6 (2 conejos) y a las 8 semanas (2 conejos) tras la realización de la lesión y la colocación de Triosite[®]. Hasta las dos semanas apreciamos un lecho hemorrágico con un infiltrado inflamatorio reactivo a la lesión. A la segunda semana se observa el inicio de la formación de osteoide por parte de los osteoblastos. En la cuarta semana es evidente la formación de osteoide por parte de los osteoblastos que se disponen en hilera, y presentan una morfología ovoidea característica de su estado metabólicamente activo. Los hallazgos histológicos a la sexta y octava semanas son similares a los apreciados en la cuarta, con la salvedad de una mayor presencia de osteoclastos y osteocitos, en relación con una fase más avanzada del proceso de reparación ósea.

Al ser nuestra hipótesis que la adición de ADSCh a Triosite[®] facilitaría y aceleraría la reparación ósea, consideramos que el mejor momento para valorar las posibles diferencias sería aquel más próximo a la lesión en el que existiese una mayor actividad osteoblástica. Así decidimos que las cuatro semanas tras la lesión sería el momento más adecuado para la realización de nuestro estudio comparativo.

Figura 34. En estas microfotografías se observan las características histológicas en tinción Hematosilina/Eosina en relación a la evolución de Triosite® (sin células) a 1, 2, 4, 6 y 8 semanas del implante (**Figuras A, B, C, D y E**, respectivamente).

A la izquierda: aumento original 100x, barra 200 µm; a la derecha: aumento original 400x, barra 50 µm.



a: Osteoide. **b:** Osteoblasto. **c:** Osteocito. **d:** Osteoclasto. **e:** Triosite®.

3.6.3. Evolución clínica de los animales del ensayo

Durante el postoperatorio, de los 15 conejos incluidos en el ensayo, se excluyeron 3 conejos. A la semana, uno de ellos presentaba eritema, tumefacción y supuración en la herida de la pata derecha, compatible con infección de la herida quirúrgica. En los otros dos se produjeron sendas fracturas durante las primeras dos semanas del postoperatorio, objetivadas por impotencia funcional, deformidad y crepitación local. La evolución clínica de los 12 conejos restantes incluidos en el ensayo transcurrió sin complicaciones. Mantuvieron su curva de peso fisiológica hasta el momento del sacrificio a las cuatro semanas.

3.7. Reparación ósea

3.7.1. Estudio histológico

Se realizaron tinciones con Hematosilina/Eosina y Tricrómico de Masson de las muestras recogidas. Se objetivó la biocompatibilidad con Triosite® al observar la presencia de osteoblastos en contacto con dicho material, así como la producción de osteoide en íntima relación con el mismo. La presencia de osteoblastos en hilera pone de manifiesto que se trata de células en actividad. Estas células presentan una morfología ovoidea con un amplio citoplasma basófilo reflejo de su estado metabólicamente activo para la producción de matriz extracelular. Son células mononucleares con un nucléolo prominente. Estas células quedan embebidas en la matriz por ellas formadas, reduciendo su tamaño y dando lugar a los osteocitos.

La presencia de osteoclastos también es evidente en las preparaciones y se muestran como células multinucleadas de gran tamaño. Estas células aparecen en depresiones reabsorbidas de la superficie calcificada, tanto de Triosite® como del nuevo hueso formado. Cuando estas depresiones se producen en el hueso se denominan “lagunas de Howship”.

Estas lagunas también son observadas en nuestras preparaciones. La presencia de osteoclastos activos es un indicativo de la actividad metabólica normal del hueso en el que se ha implantado el injerto. Los osteoclastos, activados a su vez por los osteoblastos presentes en el foco de la lesión, están iniciando a las cuatro semanas un proceso de resorción del fosfato tricálcico, así como de la matriz ósea extracelular.

Figura 35. Detalle a 400x en Hematosilina/Eosina de una muestra a las 4 semanas de la lesión en la que se observa la presencia de las lagunas de Howship (*asterisco*) sobre una trabécula, dentro de la cual se observan osteocitos nucleados en íntima relación con Triosite[®] (*flecha*).

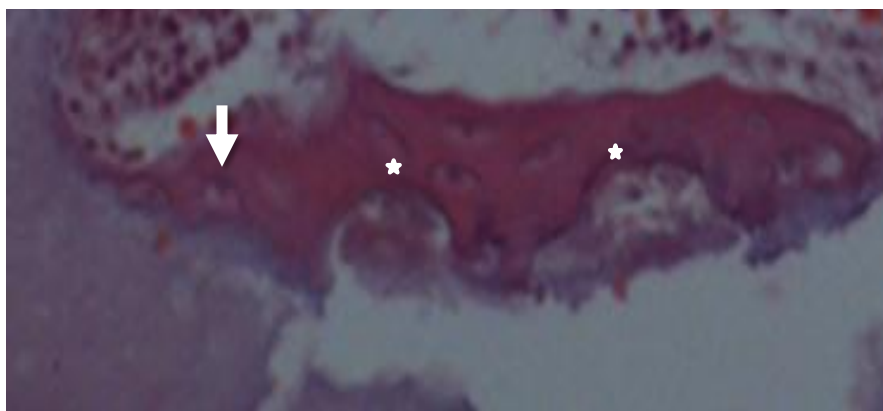


Figura 36. Detalle a 400x en Hematosilina/Eosina de una muestra a las 4 semanas de la lesión en la que se observa la presencia de osteoclastos sobre Triosite[®], procediendo a la resorción del mismo. El fosfato tricálcico presenta en tinción Hematosilina/Eosina una coloración basófila de estructura amorfa.

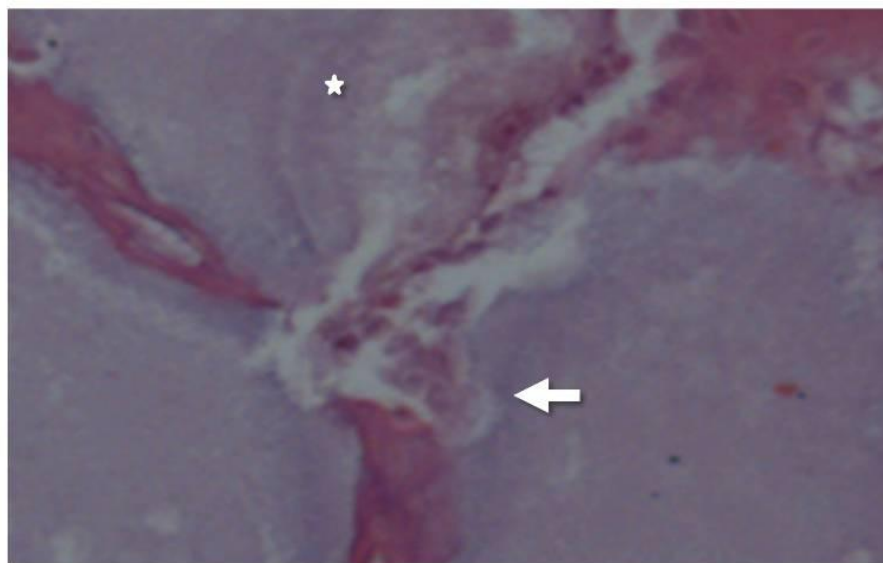


Figura 37. Tinción con tricrómico de Masson a 100x a las 4 semanas. Con esta técnica se tiñen de color azul las fibras de colágeno. Se aprecia en esta preparación la cortical (c) interrumpida por la lesión producida en el ensayo, donde se aprecia Triosite[®] y la matriz extracelular neoformada (o).

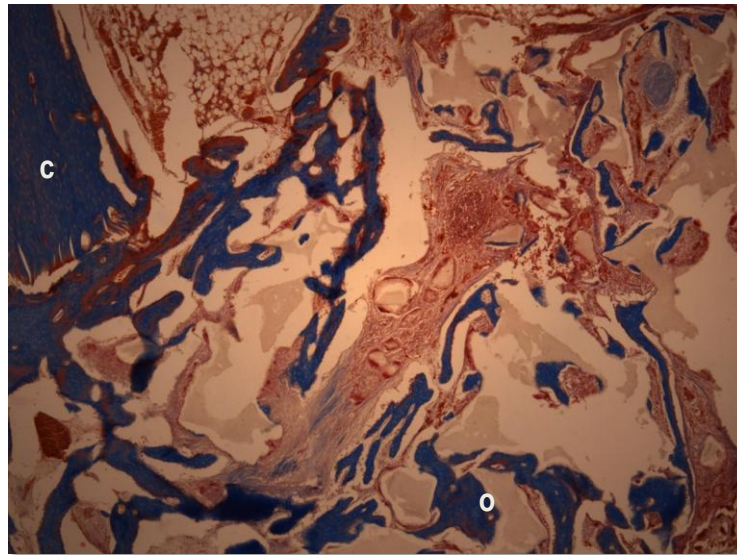
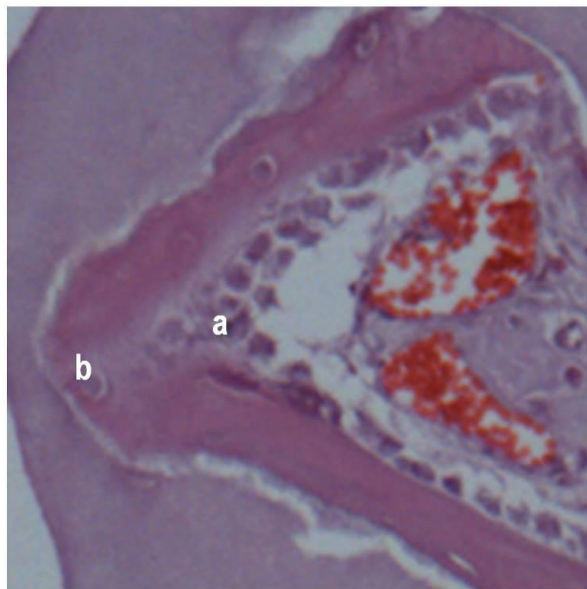


Figura 38. Detalle a 400x tinción en Hematosilina/Eosina a las 4 semanas. Se observa el nuevo osteoide formado en el que se aprecian osteoblastos en hilera (a) y células embebidas en el osteoide: osteocitos (b).



3.7.2. Estudio histomorfométrico

Se realizó el estudio histomorfométrico utilizando la herramienta informática IMAG J. A continuación se presentan las medias de los *ratios* osteoide/Triosite® con sus desviaciones estándar.

Tabla 9. Estudio histomorfométrico que presenta las medias de los *ratios* matriz extracelular/Triosite® con sus desviaciones estándar.

Conejo	-ADSCh			+ADSCh		
	IZQUIERDO			DERECHO		
	N	Media	DE	N	Media	DE
1	4	0,30995	0,07746786	3	0,68738864	0,27614759
2	6	0,45268794	0,1499109	3	0,69513765	0,06573833
3	3	0,7863213	0,71815125	5	0,64193894	0,3298308
4	3	0,20034334	0,06762495	3	1,11660037	0,48138866
5	6	0,94149397	0,46621496	5	1,58587789	0,2431522
6	3	0,5644	0,06421129	7	0,62885011	0,46864087
7	5	0,61375341	0,12301072	5	0,94259637	0,46864087
8	3	1,12032772	0,6442328	2	0,85385729	0,6442328
9	7	0,43584303	0,26228715	5	0,54412314	0,09891468
10	5	0,43046762	0,17331513	5	1,45088137	0,76145377
11	5	0,23337263	0,07879949	3	0,30889405	0,25762401
12	4	0,53892967	0,26939558	4	0,69203669	0,30665079

ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo; DE: desviación estándar.

El análisis estadístico por medio de la comparación de las medias utilizando la T de *Student* para muestras pareadas nos da una $p = 0,0257$, señalando la diferencia estadísticamente significativa entre el húmero control y el húmero tratado.

Tabla 10. Resultados del estudio estadístico.

-ADSCh		+ADSCh	
Media	DE	Media	DE
0,55232422	0,2789012	0,84568188	0,37367291

incremento (%) 34,6888902 $p = 0,0257$ (t *student* pareado)

ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo;

DE: desviación estándar.

Se produjo un incremento medio en la producción de matriz ósea neoformada del **34,68%** en los húmeros tratados con Triosite® más células troncales de tejido adiposo, comparado con aquellos húmeros que únicamente fueron tratados con Triosite®. A continuación se presentan las gráficas comparativas de cada uno de los animales y del total de las muestras analizadas.

Figura 39. Efecto de las ADSCh en la formación de matriz ósea en cada uno de los animales del estudio.

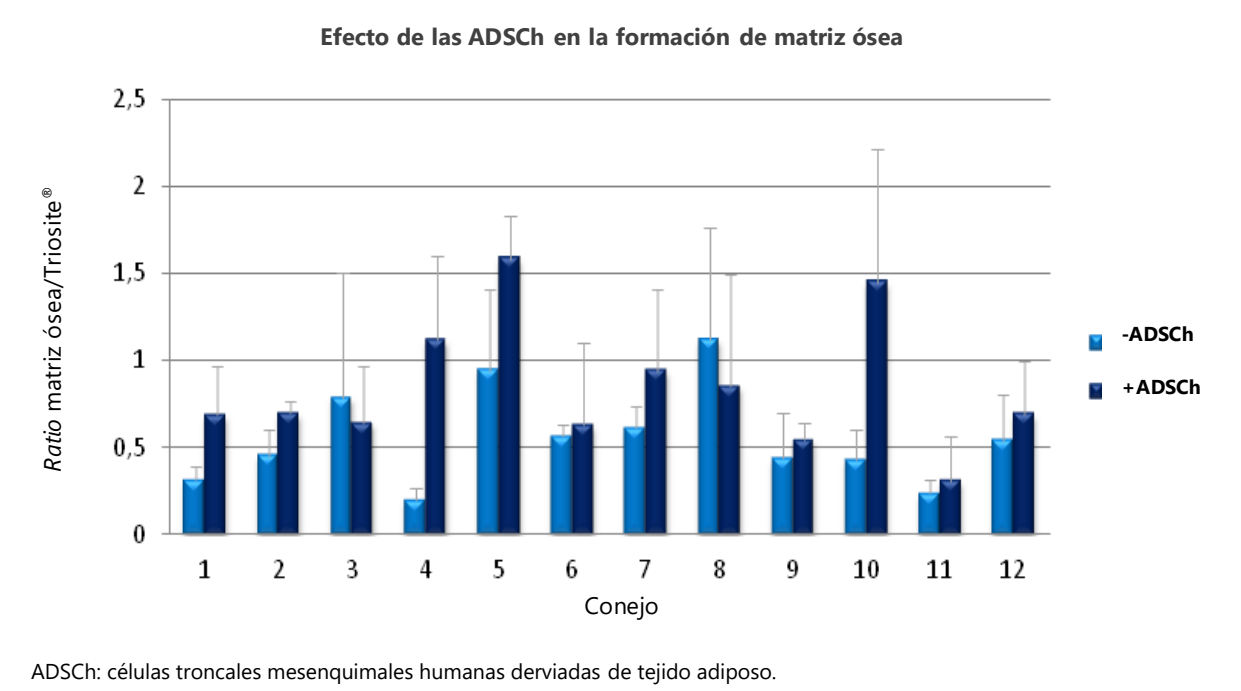
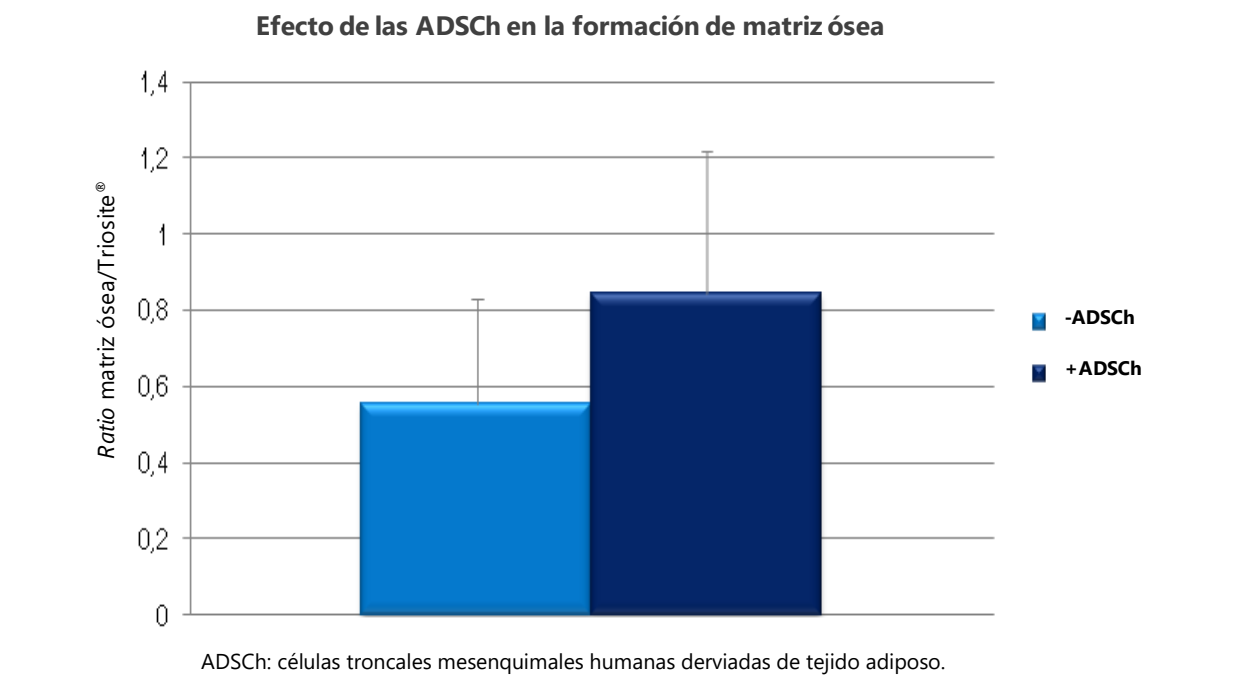


Figura 40. Efecto de las ADSCh en la formación de matriz ósea.



4. CAPÍTULO 4 DISCUSIÓN

4.1. Utilización de células troncales procedentes de grasa

El descubrimiento de la existencia de células pluripotenciales en el tejido adulto ha abierto una importante línea de investigación en el campo de la fisiopatología y la terapéutica. Estas células participarían en la homeostasis de tejido sano, al tiempo que intervienen en los mecanismos de reparación tisular. Este hecho ha propiciado el desarrollo de la terapia celular en busca de dirigir y amplificar este fenómeno fisiológico en pos del tratamiento de las enfermedades independientemente de su etiología.

En este estudio hemos utilizado células troncales procedentes de grasa. La presencia de estas células en el tejido adiposo fue descrita en 2001 por Zuk y cols. Estas células presentan la capacidad de proliferación y diferenciación a la línea osteogénica, adipogénica, condrogénica y miogénica [37], y tienen la ventaja de su obtención sencilla y poco traumática, siendo el rendimiento de su proceso de obtención hasta 100 veces superior al del aspirado de médula ósea [47]. Existen pocos trabajos comparativos sobre la capacidad osteoformadora de las ADSC frente a las BMSC procedentes de médula ósea. Destacamos el artículo publicado por Cowan y cols. en 2004 en el que la actividad osteoformadora de las MSC procedentes de la grasa y la médula ósea eran semejantes [90]. En la misma línea, Hui y cols. realizaron un estudio comparativo en un modelo de lesión fisaria en conejos. No encontraron diferencias en cuanto a los índices de proliferación celular, pero sí describen diferencias a favor de las células derivadas de la médula ósea en cuanto a las características histológicas del tejido neoformado [91]. Más recientemente, Niemeyer y cols. en un artículo comparativo utilizando ambos tipos de células, administradas en un biomaterial diferente, describen un mayor potencial osteogénico de las células procedentes de médula ósea, aunque la adición de PRP compensaba parcialmente esta diferencia [92].

Para la obtención de las células en nuestro estudio utilizamos inicialmente grasa de epiplón de conejo, al ser el conejo nuestro modelo de estudio. Sin embargo, pronto nos encontramos con problemas técnicos que dificultaron esta vía. La caracterización de las células es un hecho básico en terapia celular.

Es imprescindible saber con qué tipo de células estamos trabajando para que nuestras conclusiones sean sólidas y acertadas. La caracterización de las células troncales mesenquimales pasa por los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular: formación de colonias fibroblastoides, inmunofenotipo específico y diferenciación. El inmunofenotipo viene determinado por la expresión de determinados marcadores de superficie, que son detectados por citometría de flujo con la utilización de anticuerpos específicos frente a los mencionados marcadores. Las dificultades técnicas y presupuestarias en el desarrollo de anticuerpos específicos para células de conejo (dada la inexistencia de *kit* comerciales específicos para estas células y, por tanto, no poder asegurar que estábamos trabajando con verdaderas células troncales derviadadas de tejido adiposo), nos hizo replantearnos la obtención de las ADSC. En nuestra revisión crítica de trabajos publicados y la valoración de estudios presentados en congresos sobre la materia, hemos observado una falta de rigurosidad en muchos experimentos en los que la caracterización de las células obtenidas no es la adecuada, obviando los estudios de inmunofenotipado de las células utilizadas y seleccionando las células únicamente por su adherencia al plástico. De esta forma es posible que las células utilizadas no sean verdaderas células troncales, lo que hace que los resultados obtenidos en estos experimentos no sean concluyentes.

Las ADSC tienen la capacidad de inducir inmunotolerancia, haciendo posible la utilización alogénica de estas células sin la necesidad de una supresión inmunitaria del huésped [51]. Esta capacidad de las ADSC ha hecho que sea incluso factible su utilización como xenotrasplante, siendo habitual la utilización de células ADSCh en experimentación animal [52].

La revisión de la literatura al respecto nos mostró que numerosos estudios en experimentación animal estaban siendo realizados con células humanas, que sí pueden ser fácilmente caracterizadas dada la estandarización y disponibilidad de anticuerpos comerciales para numerosos marcadores. Las ADSC presentan bajos niveles de moléculas HLA clase II y no expresan moléculas coestimuladoras: CD40, CD80 o CD86 [31]. Muchos son los modelos animales de enfermedad en los que las células troncales mesenquimales han demostrado eficacia. En la mayoría de estos estudios se han utilizado células humanas en modelos murinos inmunocompetentes.

En estos modelos las células humanas xenogénicas no son reconocidas por el sistema inmunológico del huésped, permitiendo su migración a tejidos inflamados, donde actuarían modulando el proceso inflamatorio y favoreciendo la reparación tisular [33, 34, 35, 36].

Cabe preguntarse si, pese a existir una tolerancia inmunológica, la actividad reparadora, en nuestro caso osteoformadora, de células no autólogas es menor que la de las células autólogas a la hora de plantear la traslación de los resultados experimentales. En este sentido, es de enorme interés el estudio publicado por Liu y cols. en el que comparan la capacidad osteoformadora de las ACSC autólogas frente a las alogénicas en un modelo animal. Los autores concluyen que no existen diferencias significativas entre los dos tipos de células [93]. Algunos autores han considerado la prediferenciación a la línea osteogénica de las células progenitoras mesenquimales para el tratamiento de lesiones óseas. En un trabajo en este sentido Shah y cols. publicaron sus resultados en 2014, no encontrando diferencias en su modelo en rata de defecto óseo tratado con ADSC prediferenciadas y no prediferenciadas [94].

Con estos antecedentes decidimos utilizar células humanas del Banco Nacional de Células Somáticas (Inbiobank). Estas células fueron cultivadas, realizando subcultivos semanales hasta un máximo de 30 duplicaciones desde la siembra. Las alteraciones genéticas que pueden sufrir las células en cultivo es una de las grandes preocupaciones de la terapia celular. En este sentido, las agencias sanitarias reguladoras recomiendan un máximo de duplicaciones en un intento de evitar esta posible complicación. Sabemos que a partir de las 50 duplicaciones (límite de Hayflick) las células en cultivo alcanzan la senescencia, y es cuando son más susceptibles de sufrir alteraciones génicas. En la actualidad la AEMPS no recomienda el uso en terapia humana de células con más de 30 duplicaciones acumuladas.

En nuestro trabajo, el cultivo fue estable hasta la séptima semana en el estudio de Duplicaciones de Población Acumuladas (alcanzando las 30 duplicaciones), en consonancia con la literatura actual y las recomendaciones de la AEMPS.

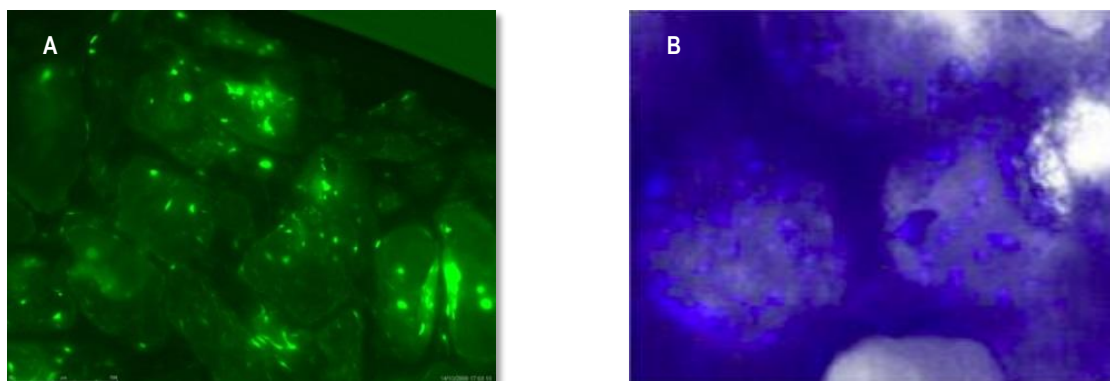
Para comprobar que las células utilizadas eran realmente ADSCs realizamos el estudio de los marcadores de superficie. Obtuvimos como marcadores positivos CD73, CD90 y CD105, siendo negativos CD11b (marcador de monocito), CD45 (marcador para células de origen hematológico) y HLA-DR (antígeno mayor de histocompatibilidad tipo DR que presentan las células inmunogénicas, este marcador se positiviza con la diferenciación de las células troncales mesenquimales). Este perfil cumple los criterios del ISCT para células troncales mesenquimales pluripotentes [26, 53]. Estudiamos, asimismo, la formación de colonias de aspecto fibroblástico y su capacidad de diferenciación osteogénica por medio de tinción con Rojo de Alizarina, y valoración de la actividad de la fosfatasa alcalina y la expresión de osteocalcina en el cultivo *in vitro*. Asimismo, realizamos un estudio del cariotipo de las células en cultivo para descartar la presencia de anomalías genéticas, en colaboración con el Laboratorio de Citogenética de nuestro hospital. Los resultados en todos los casos fueron concordantes con las especificaciones publicadas en la literatura [95].

4.2. Biocompatibilidad de Triosite® y caracterización del preparado

Nuestra primera preocupación a la hora del diseño del estudio fue encontrar un vehículo adecuado para el implante de las células. Para ello realizamos una revisión extensa de la literatura y decidimos iniciar un estudio de biocompatibilidad con una cerámica bifásica (hidroxiapatita-fosfato tricálcico: Triosite®), que posee propiedades osteoconductoras y unas características físicas favorables a la siembra de células como son el tamaño del poro y su velocidad de resorción. La hidroxiapatita es una cerámica con una gran biocompatibilidad y, especialmente, bioactiva al permitir la aposición de tejido óseo en íntimo contacto con su superficie. Esta cerámica cuenta con la desventaja de su fragilidad y lenta resorción. El fosfato tricálcico tiene una resorción más rápida y cuenta con la ventaja de su microarquitectura, muy semejante a la del hueso esponjoso, favoreciendo el proceso de angiogénesis y colonización celular. En lo que se refiere a la porosidad del material, hoy sabemos que la formación de osteoide requiere un poro mínimo de 100 µm, con un tamaño ideal entre 300 y 500 µm [74]. El Triosite® combina macroporos de 300 a 600 µm y microporos de menos de 10 µm que facilitan la interconectividad de los macroporos, mejorando así la tensión local de O₂ y, por tanto, facilita la diferenciación de las células troncales a la línea osteoblástica.

Nuestros resultados han constatado la adhesión de las ADSCh en monocapa a la superficie de Triosite[®] a partir de las 3 horas de su incubación. Este hecho fue visualizado por tinción con HE, por microscopía de fluorescencia y por microfotografía de contraste de fase, obteniendo resultados comparables a los publicados por Seebach y cols. [83].

Figura 41. A. ADSCh marcadas con proteína verde fluorescente al microscopio de fluorescencia. B. ADSCh marcadas con DAPI al microscopio de fluorescencia [83].



ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo; DAPI: diamino fenilindol.

Asimismo, nos propusimos valorar la diferenciación de las ADSCh en el biomaterial. Para ello realizamos un estudio histológico con Rojo de Alizarina, y determinamos la actividad de la fosfatasa alcalina y la expresión de osteocalcina. Se cultivaron las ADSCh + Triosite[®] en medio de diferenciación osteogénico durante 28 días. La adición del medio de diferenciación es necesaria, ya que el biomaterial utilizado carece de propiedades osteoinductoras y, por tanto, no participa en la diferenciación de las células troncales.

La tinción con Rojo de Alizarina no nos permitió diferenciar entre el material con y sin células, dado que el calcio presente en la cerámica bifásica positiviza la tinción.

En cuanto a la fosfatasa alcalina, encontramos un máximo de expresión a las 2 semanas, con un perfil superponible a los datos obtenidos en la diferenciación de las ADSCh cultivadas directamente en plástico. Los niveles de osteocalcina medidos a los 7, 14, 21 y 28 días mostraron un perfil característico de producción de osteocalcina por células osteoblásticas, confirmando su diferenciación. Al comparar los estudios con los obtenidos en plástico, no observamos diferencias en el patrón temporal. Otros autores

han publicado un incremento en la actividad osteoblástica de cultivos de células troncales mesenquimales procedentes de médula ósea en hidroxiapatita comparados con controles únicamente en medio de diferenciación osteogénico, siendo el biomaterial utilizado distinto al nuestro [96]. Basándonos en nuestros resultados podemos concluir que el cultivo en Triosite® de las ADSCh no se ve afectado en ningún sentido en su diferenciación osteogénica.

4.3. El modelo animal

La traslación de los hallazgos *in vitro* a la clínica pasa por el desarrollo de modelos animales que sustenten estos hallazgos en un diseño lo más próximo a la patología humana que se pretende tratar. El animal elegido por nosotros fue el conejo. Por una parte, su manipulación es técnicamente más sencilla que los pequeños roedores, haciendo más reproducibles los resultados obtenidos, y su coste económico y estabulación eran factibles con el presupuesto y las condiciones con las que contaba el equipo investigador. Por otra parte, existe gran experiencia publicada en la utilización del conejo en estudios músculo-esqueléticos [67]. Es de reseñar que, aunque la densidad mineral ósea del conejo es similar a la del humano, el metabolismo óseo es más rápido y existen diferencias en su anatomía y vascularización, hechos que debemos tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos [68]. El defecto crítico en el conejo se ha descrito como lesiones óseas de entre 4 y 6 mm. Los modelos de defecto crítico conllevan lesiones amplias, la utilización de material de estabilización y el objetivo final es el puenteo de la lesión no pudiendo valorar los estadios intermedios [66].

Nuestra principal variable de estudio no era la reparación de la lesión, si no la valoración de la actividad osteoblástica con la producción de matriz ósea, con lo que el modelo de defecto crítico no sería adecuado. Así decidimos realizar una intervención con la máxima reproducibilidad, la mínima agresión y mínimas complicaciones posibles sin la necesidad de la utilización de ortesis ni material de osteosíntesis, sacrificando a los animales antes de que se produjese la reparación de la lesión. Atayde y cols. presentaron recientemente su trabajo en el desarrollo de un modelo animal para el estudio de la regeneración ósea inducida por biomateriales. En su estudio demostraron la idoneidad del modelo de lesión unicortical frente al defecto crítico, permitiendo la valoración de todos los estadios del proceso de

reparación ósea en periodos de corta duración, siendo una técnica quirúrgica simple y bien tolerada por los animales, en este caso un modelo ovino [97].

Para la definición del modelo se utilizaron siete conejos hembra adultos Blanco New Zealand. Inicialmente realizamos una lesión con la broca de 4,5 mm en el fémur, pero tanto la lesión bicortical como la monocortical conllevaban fractura diafisaria bien durante la cirugía o en el postoperatorio. Decidimos entonces realizar la lesión en el húmero en el que las solicitaciones mecánicas son mucho menores en el conejo. Finalmente, decidimos realizar la lesión unicortical con la broca de 3,2 mm que presentaba un diámetro suficiente para su relleno con el material cerámico y no presentaba dificultades técnicas ni fractura en el postoperatorio con la deambulación del animal.

Nuestra siguiente decisión fue el tiempo para el sacrificio del animal tras el tratamiento, buscando el momento de máxima actividad osteoblástica. En el humano sabemos que la actividad osteoblástica se inicia a partir de la primera semana posfractura, iniciándose la calcificación del material osteoide a partir de la tercera semana y, a partir de la sexta, comienza el remodelado óseo. En nuestro estudio realizamos una valoración de la evolución natural de la lesión ósea en el modelo animal. Para ello se sacrificaron animales tras la primera semana (2 conejos), y a las 2 (2 conejos), a las 4 (2 conejos), a las 6 (2 conejos) y a las 8 semanas (2 conejos) de la realización de la lesión y la colocación de Triosite[®] sin células. En el estudio histológico de las muestras encontramos que a la cuarta semana la presencia de matriz ósea era más evidente, manteniendo un nivel similar hasta la octava semana. En base a estas observaciones, decidimos que las 4 semanas tras la lesión sería el momento más adecuado para valorar el posible efecto de nuestra intervención sobre la reparación ósea y, por tanto, en la producción de matriz ósea. Otros estudios en roedores utilizan un calendario semejante al nuestro. Taylor y cols. en un estudio en ratones para la valoración de la reparación en un modelo de fractura analizan los parámetros de su estudio a los 10 y 20 días tras la lesión [98]. En un modelo de fractura en rata para el estudio de la regulación genética de la reparación ósea, Hadjiargyrou y cols. afirman que en el día 21 se iniciaría la fase de remodelado óseo [54]. Zhao y cols. publicaron en 2011 sus resultados en un modelo de fractura en conejo para la reparación de un defecto crítico en el radio con la utilización de un implante enriquecido con células

troncales mesenquimales procedentes de médula ósea. Los autores describen la consecución de la reparación ósea, tanto radiológica como histológica, a las 12 semanas tras la lesión [99].

Un interesante estudio histomorfométrico comparativo en conejo sobre la reparación ósea fue publicado por Dallari y cols. en 2006. En dicho estudio analizaron las características histológicas de la lesión a las 2, 4 y 12 semanas, encontrando diferencias en la reparación ósea ya a las 2 semanas, siendo estas mayores a las 4 y manteniéndose hasta las 12 semanas [100]. Más recientemente Schlickewei y cols. han publicado un trabajo, también en conejo, sobre la reparación ósea, valorando en este caso la producción de material osteoide, concluyendo que este es máximo a las 2 semanas, manteniéndose a las 4 y 12 semanas [101].

Nuestro objetivo fue realizar el estudio en el momento en el que la actividad osteoblástica de formación de la matriz extracelular hubiese llegado a su máximo nivel, momento en el que las posibles diferencias serían máximas. Nuestra valoración cualitativa apuntaba a las 4 semanas. Las publicaciones que presentan datos en este sentido nos hablan en el modelo de ratón y rata en torno a los 10-20 días, y en el de conejo entre las 2 y 4 semanas, con consolidación completa de defectos críticos a las 12 semanas. En base a estos datos, decidimos la realización del estudio y sacrificio de los animales a las 4 semanas de la lesión y tratamiento.

Como control utilizamos el miembro contralateral del mismo animal. Este es un hecho controvertido debido a los posibles efectos cruzados publicados por algunos autores en el estudio del efecto osteoformador de los factores de crecimiento. Sumner y cols. publicaron sus resultados en un modelo canino de reparación ósea, señalando los efectos remotos de la aplicación local de *rhBMP-2* [102]. Los autores de este trabajo recomiendan la utilización de controles externos para obviar este posible efecto. Dallari y cols. en su trabajo sobre la reparación ósea con terapia celular en un modelo de conejo no encontraron este posible efecto de confusión, comparando los controles contralaterales con controles externos, sin encontrar diferencias. En nuestro estudio no utilizamos controles externos, pero la existencia de un efecto remoto tras la aplicación local de las ADSCh tendría un efecto negativo sobre el resultado de la comparación, haciendo que la existencia de resultados favorables a la implantación celular fuesen aún más consistentes.

4.4. Resultados histológicos e histomorfométricos

Para la realización de los estudios histológicos se realizaron secciones de los húmeros en forma longitudinal sobre la lesión y se realizó tinción con Hematoxilina y Eosina y con Tricrómico de Masson. Observamos la presencia de osteoblastos en contacto íntimo con el Triosite[®], corroborando la biocompatibilidad de este material. Observamos también la presencia de osteoblastos ovoideos con amplio citoplasma basófilo y en hilera, signo de la actividad osteoformadora de los mismos y la aposición de matriz extracelular sobre el Triosite[®].

También objetivamos la presencia de osteoclastos, aunque en menor número, en depresiones reabsorbidas tanto de Triosite[®] como del hueso. La presencia de osteoclastos activos es un factor indicativo de la actividad metabólica normal del hueso en el que se ha implantado el injerto, y muestra el inicio a las 4 semanas de un proceso de resorción de la cerámica.

El Triosite[®] utilizado consiste en una cerámica bifásica: hidroxiapatita (el 60%) y beta fosfato tricálcico (el 40%). La hidroxiapatita ha sido tradicionalmente considerada como una cerámica no reabsorbible, pero hoy sabemos que se produce una lenta degradación mediada por la actividad osteoclástica. En un estudio realizado en ovejas se observó la presencia de osteoclastos adheridos a la superficie del material a las 6 semanas de su implantación, con formación de lagunas de resorción y la presencia de fagosomas con cristales de fosfato cálcico [103]. El beta fosfato tricálcico presenta una rápida resorción, mediada tanto por procesos químicos como celulares. Dependiendo de su estructura, se ha descrito la resorción completa del biomaterial entre los 6 y los 24 meses. Witfang y cols. demostraron en un modelo animal porcino la presencia de una degradación por hidrólisis y por resorción celular de este tipo de cerámica. En su modelo se había producido la resorción completa del material a los 20 meses de su implantación, comprobando su capacidad osteoconductora y propiciando la reparación de defectos óseos [104].

La rapidez de degradación del fosfato tricálcico se ha relacionado con la inducción de un proceso inflamatorio local y la pérdida de soporte estructural. En nuestro estudio no observamos la presencia significativa de infiltrados inflamatorios alrededor de Triosite[®].

El desarrollo de las cerámicas bifásicas pretende aunar los beneficios de la resorción del fosfato tricálcico con los beneficios estructurales de la hidroxiapatita.

Hooper y cols. valoraron en la clínica los posibles beneficios de esta combinación y su utilización como sustituto óseo en las osteotomías de tibia de adición. En todos los casos consiguieron la consolidación ósea, con un adecuado reemplazo por tejido óseo, aunque también en todos se objetivó la presencia de áreas de biomaterial no reabsorbido [78].

Comprobada la biocompatibilidad del material y su valor como osteoconductor, buscamos un parámetro cuantitativo que nos permitiera valorar el efecto de la adición celular sobre la reparación ósea. Siguiendo nuestra hipótesis, la adición de células mesenquimales pluripotenciales aumentaría el número y la actividad osteoblástica, y siendo la producción de matriz extracelular el reflejo de su actividad, consideramos que la medición de la producción de esta matriz sería el parámetro a valorar.

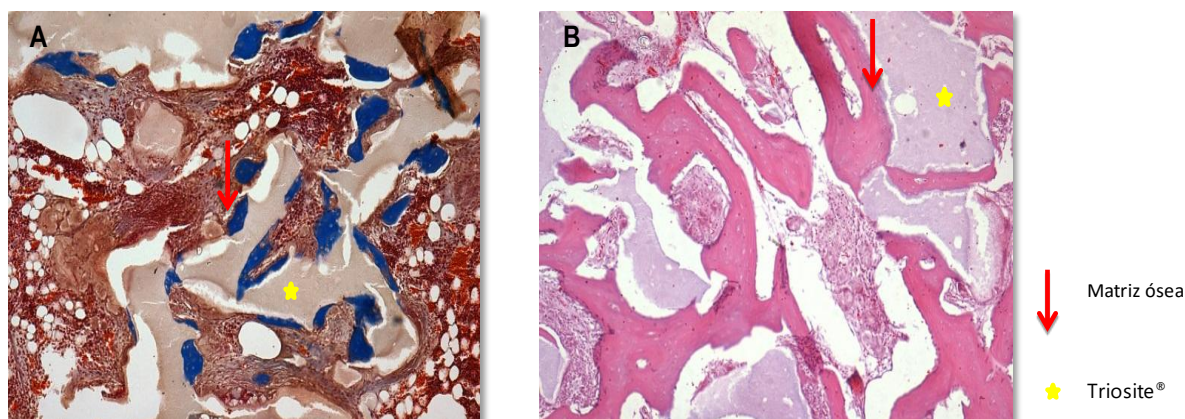
La histomorfometría realiza una evaluación cuantitativa de la microarquitectura ósea, su remodelación y metabolismo, evaluando tanto aspectos dinámicos como características estáticas del hueso. Se valoran parámetros estructurales, estáticos de formación ósea, dinámicos de formación ósea, y parámetros de resorción ósea. Dentro de los parámetros de formación ósea estáticos se encuentra el grosor de la capa de osteoide, la relación superficie de osteoide/superficie ósea, la relación volumen de osteoide/volumen óseo y la relación superficie recubierta de osteoblastos/superficie ósea, en todos los casos expresada en tanto por ciento [69].

Recientemente, la Sociedad Americana de Investigación Ósea y Mineral ha publicado una actualización sobre su publicación previa del consenso de 1987 en referencia a los estudios histomorfométricos [105]. En dicho trabajo se define el osteoide como matriz ósea no mineralizada que, de forma fisiológica, será totalmente mineralizada; y considera al hueso (en su acepción de tejido y no como un órgano individual del sistema esquelético) como la matriz ósea, incluyendo tanto al osteoide como al hueso mineralizado.

Basándonos en los estudios histomorfométricos descritos y en las características particulares de nuestro trabajo, buscamos un parámetro de formación ósea que nos permitiese conocer la formación de hueso en relación con Triosite[®] administrado, y teniendo en cuenta las dos condiciones de nuestro estudio: Triosite[®] con células ADSCh y sin células ADSCh. La relación superficie de osteoide/superficie ósea de la histomorfometría clásica la transformamos considerando nuestro experimento. Así sustituimos la "superficie de osteoide" por superficie de "neoformación de hueso" en el sentido del Consenso de 2012 (matriz extracelular tanto calcificada como no calcificada), y la "superficie ósea" fue sustituida por la "superficie de la cerámica bifásica", siendo este nuestro parámetro: **superficie de hueso (matriz ósea)/superficie Triosite[®]**.

La histomorfometría ósea precisa la no decalcificación del tejido óseo para hacer posible la diferenciación entre matriz mineralizada y no mineralizada. Sin embargo, nuestro parámetro histomorfométrico **matriz ósea/superficie Triosite[®]** no permitiría la decalcificación, ya que la cerámica bifásica está compuesta de hidroxiapatita y fosfato tricálcico, no conteniendo fibras de colágeno, componente fundamental de la matriz ósea del proceso de neoformación ósea. Esto nos permitió obviar las dificultades técnicas de la no decalcificación, que precisa de impregnación en metil-metacrilato con un estricto control de las condiciones de temperatura durante el proceso, un micrótopo específico no disponible en nuestro laboratorio para su corte, y una formación altamente cualificada para su manejo. La tinción clásica con HE nos permitió diferenciar claramente la matriz ósea rica en colágeno y eosinófila, de la cerámica amorfa y discretamente basófila. La decalcificación de la muestra y su tinción con Hematoxilina/Eosina también ha sido utilizada por otros autores en el estudio de la actividad osteoformadora de las células ADSC [90]. En nuestro caso, además, utilizamos la tinción con Tricrómico de Masson que tiñe las fibras de colágeno de azul.

Figura 42. **A.** Preparación teñida con Tricrómico de Masson: matriz ósea, Triosite®. **B.** Preparación teñida con Hematoxilina/Eosina: matriz ósea, Triosite®.



Una vez procesada y teñida la muestra ósea, efectuamos la valoración por microscopía óptica, con la realización de fotografías sobre diferentes campos, que fueron procesadas con el sistema informático IMAGE J que facilita la lectura de las preparaciones por medio de fotografía digital y asignación de píxeles a la lectura. Esta técnica ha demostrado su indicación y reproducibilidad para el estudio histomorfométrico óseo [106].

El sistema IMAGE J ha sido desarrollado por el *National Institute of Health* (NHI), siendo de uso público. Se trata de un sistema de análisis de imagen y soporta gran número de formatos electrónicos. Este sistema nos ha permitido el cálculo de las áreas a partir de la selección manual realizada sobre una microfotografía digital. Así se seleccionaron las áreas correspondientes a la matriz ósea neoformada y las áreas que correspondían al Triosite® expresándose en número de píxeles, y se calcularon las *ratios* entre ambas variables. Se realizaron una media de cuatro lecturas de cada espécimen.

Los resultados de nuestro estudio mostraron que la adición de células ADSCh a la cerámica bifásica producía un aumento en la producción de matriz ósea del 34,68% y que esta diferencia era estadísticamente significativa con una $p = 0,0257$.

En un estudio publicado en 2015, Schlickewei y cols. valoran el efecto osteoconductor y la biocompatibilidad del fosfato cálcico en un modelo animal muy similar al nuestro. Comparan la adición de bifosfonatos a la cerámica y realizan un estudio histomorfométrico a las 2, 4 y 12 semanas de la implantación.

Los autores encuentran un aumento de la producción de osteoide ya en la segunda semana, y en la cuarta semana el inicio del proceso de maduración de la matriz extracelular no mineralizada. La variable volumen de osteoide/volumen de hueso presentó diferencias significativas a favor del grupo con fosfato cálcico sin bifosfonatos, siendo esta diferencia máxima a las 2 semanas [101].

La adición de células con capacidad osteogénica a un material osteoconductor convertiría a este en un injerto osteoformador. En 2006 el grupo de Dallari y Giuntli del Instituto Rizzoli publicaron sus resultados con la utilización de células estromales procedentes de médula ósea. Realizan los autores un estudio histomorfométrico, concluyendo que la combinación de injerto óseo liofilizado, células mesenquimales procedentes de médula ósea y plasma rico en plaquetas acelera la reparación del hueso. Se trata de los primeros estudios publicados en este campo, en el que las células son autólogas de médula ósea, obtenidas por centrifugación, no expandidas, no caracterizadas y no determinándose la dosis celular utilizada. En nuestro estudio sí conocíamos la dosis celular, y las células fueron expandidas y caracterizadas, lo que nos permite tener un mayor control sobre las variables del estudio, haciendo los resultados más consistentes y reproducibles. El efecto osteoformador de la terapia celular en el estudio de Dallari fue superior al 50%. En nuestro caso presentamos un aumento del 34% en la formación de matriz ósea.

En el estudio publicado por Behr y cols. en 2011, valorando la capacidad osteogénica de las ADSC, en este caso suplementadas con factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGFA), se describe un incremento de la actividad osteoformadora del 28,7% a las 8 semanas [107]. Más recientemente Semyari y cols. han publicado un estudio sobre la capacidad osteoformadora de una matriz con ADSC en un modelo de defecto en calota en conejos. Los autores encontraron un aumento estadísticamente significativo de la reparación ósea, siendo este aumento de hasta un 20% con respecto al control [108]. Aunque la mayoría de los trabajos publicados al respecto muestran diferencias significativas en los parámetros de reparación ósea a favor de la terapia celular, es de destacar el trabajo publicado en 2006 por Dudas y cols. de la Universidad de Pittsburgh (Pensilvania, EEUU). En este trabajo no se encontraron diferencias en la reparación de un defecto en calota en conejos al comparar la matriz sin ADSC frente a matriz con ADSC, controlando el estudio con injerto autólogo óseo [109]. A continuación se presenta una **Tabla resumen** con los resultados extraídos de la literatura.

Tabla 11. Tabla resumen que muestra los resultados comparativos extraídos de la literatura sobre la capacidad osteoformadora de las células troncales.

Referencia	Modelo animal	Lesión	Tiempo	Vehículo	Células	Incremento reparación
Cowan 2004 [90]	ratón	calota	2-12 s	Poliláctico-coglicólico + hidroxiap	ADSC, BMC 3×10^4	A las 4 semanas aumento del 50% sin dif BMC y ADSC
Dallari 2006 [100]	conejo	fémur	2, 4, 12 s	Aloinjerto liofilizado	BMSC n° no especificado	50%
Dudas 2006 [109]	conejo	calota	6 s	Gelfoam, Pharmacia/Upjohn, Kalamazoo, MI	ADSC 1×10^5	NS
Viateau 2007 [110]	oveja	metat.	6 m	Coral	BMSC 8×10^6	150%
Hao 2010 [111]	conejo	radio	12 s	Hidroxiap + colágeno + ácido poliláctico	ADSC 2×10^6	NS, sí con la utilización de ADSC transfectadas con hBMP-2
Niemeyer 2010 [92]	oveja	tibia	26 s	Esponja de colágeno mineralizada	ADSC 2×10^7 BMC 2×10^7 ADSC + PRP 2×10^7	NS ADSC 20% BMC 15% ADSC + PRP
Behr 2011 [107]	ratón	calota	1, 2, 4, 8 s	Pro Osteon 22R coral (Interpore, Irvine, CA)	ADSC $1,5 \times 10^6$	28%
Girolamo 2011 [112] Arrigoni 2013 [113]	conejo	tibia	8 s	Hidroxiap	ADSC $1,5 \times 10^6$	NS, sí diferencias cualitativas a favor de ADSC
Liu 2013 [93]	perro	calota	24 s	Coral	ADSC 2×10^7	ADSC = autoinjerto
Shah 2014 [94]	rata	calota	8 s	Ácido Poliláctico	ADSC 1×10^5	ADSC = ADSC predif
Semyari 2015 [108]	conejo	calota	2, 4, 8 s	Poliamida, ácido poliglicólico, membrana amniótica	ADSC 5×10^4	20%

ADSC: células troncales derivadas de tejido adiposo; BMC: células troncales derivadas de médula ósea;

hBMP-2: proteína ósea morfogenética; PRP: plasma rico en plaquetas.

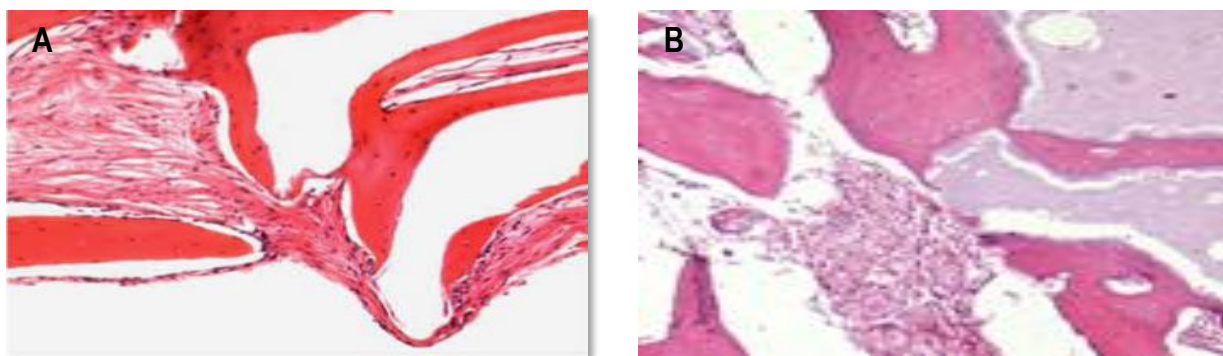
El grupo de Cowan de la Universidad de Stanford fue de los primeros en aplicar la capacidad osteoblástica de las células mesenquimales procedentes de grasa en experimentación animal para la reparación de defectos óseos [90]. Estos autores demostraron que las ADSC producían un aumento de la osificación intramembranosa a partir de las 2 semanas con una reparación completa a las 12 semanas en su modelo animal. Más recientemente Behr y cols. apoyan con sus trabajos la capacidad de reparación ósea *in vivo* de las ADSC. Estos autores realizan sus estudios en un modelo murino de defecto crítico en calota, utilizando ADSCh. Como se ha comentado previamente, y de la misma forma que nosotros utilizamos células humanas en nuestro modelo animal, la utilización de ADSCh permite una perfecta caracterización de las mismas, hecho crucial a la hora de interpretar los resultados. Behr y cols. utilizan una dosis celular de $1,5 \times 10^6$ de ADSCh [107]. La dosis utilizada en nuestro estudio fue de 3×10^6 células, una dosis empírica basada en otros estudios previos. En este sentido consideramos de interés, una vez demostrada la eficacia de las ADSCh en el modelo de reparación ósea, la realización de un ensayo comparativo a diferentes dosis para aportar conocimiento en un tema abierto al debate.

Hemos descrito previamente cómo las ADSC tienen una capacidad de diferenciación a varias estirpes celulares, dentro de las cuales se encuentran tanto la línea condral como la ósea. Sabemos también que las condiciones del microambiente van a definir la línea de diferenciación de estas células y, por tanto, definen el tipo de osteoformación: endocondral o intramembranosa. En nuestro trabajo la formación de matriz extracelular se produjo en todos los casos por aposición directa de material osteoide sobre la cerámica bifásica, no apreciando en ningún caso la producción de tejido cartilaginoso propio de la osificación endocondral. Los estudios de Colnot en la Universidad de California sobre diferenciación de las células progenitoras en la reparación de la fractura ósea revelan que las lesiones que afectan a la medular se reparan por osificación intramembranosa, mientras que las que afectan al periostio lo hacen predominantemente siguiendo la línea endocondral. La diferenciación de las células progenitoras vendría guiado por dos hechos: su procedencia y el microambiente celular. Las células procedentes del periostio tendrían una predisposición a la diferenciación condroblástica, mientras que las procedentes de médula ósea hacia la línea osteoblástica [55]. Las condiciones locales modularían esta capacidad de diferenciación, especialmente en lo que se refiere a las células procedentes de médula ósea.

En un interesante estudio de las condiciones locales en un modelo de reparación fractuaria, Taylor y cols. valoran el papel de la trombospondina-2 (TSP2) en la diferenciación de las células mesenquimales pluripotenciales. La TSP2 es una proteína de la matriz extracelular que aumenta su expresión en los tejidos lesionados y durante los procesos de desarrollo tisular. Los autores, con la utilización de un modelo de fractura de tibia en ratones que no expresan TSP2 (*TSP2-null*), demuestran que esta proteína favorece la diferenciación condrogénica de las MSC y, por tanto, la osificación endocondral [98]. Sería interesante conocer en esta línea los niveles de TCP2 en nuestro estudio, y si una variación en las condiciones locales, como son la variación en los niveles de este factor local modularían la respuesta del injerto osteoformador utilizado en nuestro ensayo.

En términos generales, podríamos aceptar que la diferenciación condrogénica se produciría en las situaciones más adversas: hipoxemia e inestabilidad del foco fractuario, con el objetivo de crear un entramado que confiriese de forma rápida estabilidad y facilitase la neoangiogénesis. En este momento el proceso de producción de tejido óseo se iniciaría en las condiciones necesarias para la producción de matriz ósea por parte de los osteoblastos y su mineralización posterior. Debemos recordar a este respecto que nuestro modelo de lesión es unicortical, asegurando de esta forma la estabilidad de la lesión y el injerto es colocado intramedularmente, lo que explicaría un microambiente favorable a la diferenciación osteoblástica de las células vehiculizadas en Triosite® y a la producción de una osificación intramembranosa.

Figura 43. En los modelos animales descritos de reparación ósea con ADSCh la osificación que se produce es intramembranosa. **A.** Behr y cols. 2011 [107]. **B.** Estudio propio.



ADSCh: células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo.

La mayoría de los estudios para la valoración de la actividad osteoformadora de las ADSC han sido realizados en modelos de defecto crítico en calota. Si bien la estructura extracelular, el componente celular y el metabolismo óseo en dicha localización son comunes a los de los huesos largos, existen diferencias anatómicas y biomecánicas que hacen necesaria para nuestra especialidad la realización de este tipo de estudios en huesos del esqueleto apendicular.

Nuestro estudio fue realizado en el húmero de conejo, en esta línea Arrigoni y cols. presentaron en 2013 los resultados de su estudio en tibias de conejo. Estos autores desarrollaron un modelo de defecto crítico tratado con ADSC vehiculizadas en hidroxiapatita a una dosis de $1,5 \times 10^6$ células. Los animales fueron sacrificados a las 8 semanas encontrando, tanto en los conejos tratados como en los controles, la reparación de la lesión y sin observar diferencias en cuanto a la producción de hueso neoformado, pero sí encontraron diferencias en las características de este tejido, siendo este más maduro en los especímenes tratados con ADSC [111, 112]. Hao y cols. en un ensayo similar estudiaron el efecto osteoformador de las ADSC en un defecto en radio de conejo. Realizaron el estudio a las 12 semanas y no encontraron diferencias significativas con respecto a los controles. En cambio, sí que encontraron diferencias cuando las ADSC eran transfectadas con el gen de la BMP-2 humana [111]. En nuestro estudio el sacrificio de los animales se realizó a las 4 semanas, dado que sabemos que el metabolismo óseo del conejo es más acelerado que el del humano y, por tanto, a las 8-12 semanas es de esperar una importante reparación ósea en situaciones fisiológicas. La adición de ADSC actuaría acelerando el proceso reparativo; bien por diferenciación a osteoblastos, bien por su actividad paracrina, o por ambas; por lo que los estudios histológicos y radiológicos deben, a nuestro entender, realizarse en estadios iniciales del proceso reparador.

De las limitaciones de nuestro estudio señalaremos, en primer lugar, la imposibilidad de saber si el aumento del 34% en la actividad osteoformadora del implante con ADSCh es debido a la diferenciación de las células transportadas y/o a su actividad paracrina. El marcaje de las células administradas nos habría proporcionado información sobre la fisiopatología de la reparación descrita.

Liu y cols. realizaron un marcaje con proteína fluorescente (GFP) de las ADSC en su modelo animal y observaron su presencia en las lagunas del hueso neoformado, lo que explicaría una contribución directa de las ADSC en la formación del nuevo hueso [93]. Las características mecánicas de esta reparación tampoco pudieron ser estudiadas en nuestro modelo animal. La valoración de estas características es importante a la hora de plantear la traslación de los resultados obtenidos. Arrigoni y cols. sí valoraron la biomecánica de la reparación obtenida en su modelo animal, observando una mejoría de las propiedades mecánicas de la reparación ósea en aquellos casos en los que se utilizó ADSC, en posible relación con una aceleración del proceso de maduración y mineralización del hueso neoformado [113]. Por último, hacer referencia al problema de la dosificación celular, un problema aún no resuelto en terapia celular. Al revisar la literatura experimental (**Tabla 11**), vemos cómo la dosis celular varía enormemente, habiéndose publicado trabajos con la administración de 5×10^4 células hasta estudios con 2×10^7 células. No existen en nuestro conocimiento estudios de dosis-efecto, hecho que sería necesario abordar para consolidar la terapia celular. En la actualidad las dosis utilizadas vienen determinadas empíricamente y en base a las limitaciones de los vehículos de administración y suspensión celular, así como al espacio físico sobre el que se va a administrar el tratamiento. En nuestro trabajo basamos la dosis en los estudios previos con la utilización del conejo como modelo animal, y la concentración celular disponible en el medio de suspensión utilizado (2×10^6 células por mililitro). Con la dosis utilizada en nuestro estudio: $2,5\text{-}3 \times 10^6$ células por tratamiento, obtuvimos un incremento en la actividad osteoformadora del 34%. Estamos planteando en la actualidad estudios en el mismo modelo a diferentes dosis para valorar su posible efecto sobre la capacidad reparativa del compuesto.

4.5. Aplicación de los resultados del estudio

La Medicina traslacional, con la aplicación de los resultados procedentes de la experimentación *in vitro* y modelos animales, permite importantes avances en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

El autor de esta Tesis Doctoral, en consonancia con los resultados obtenidos en este trabajo y con la base científica existente en el campo de la regeneración ósea con la utilización de ADSC, ha puesto en marcha un ensayo clínico sobre la utilización de ADSC, vehiculizado en una cerámica para el tratamiento de la pseudoartrosis de huesos largos en humanos. El estudio ha sido aprobado por la AEMPS y por el Comité Ético del Hospital Universitario La Paz de Madrid, y cuenta con el apoyo financiero de una empresa farmacéutica: *Ensayo clínico fase II para evaluar el efecto de las HC-SVT-1001 (células mesenquimales troncales adultas autólogas de tejido adiposo, expandidas e incluidas en biomaterial de fosfato tricálcico) en el tratamiento quirúrgico de pseudoartrosis atróficas de huesos largos* (Número EUDRACT 2013-000930-37). Se trata de un estudio prospectivo, multicéntrico, abierto, no aleatorizado y no comparativo.

El producto en investigación está constituido por ADSC obtenidas por aspiración de 100 cc de tejido adiposo del mismo paciente y cultivadas *ex vivo* con procedimientos GMP e incorporadas al biomaterial que está compuesto de fosfato tricálcico de estructura tridimensional. Se aplica directamente en el foco de a pseudoartrosis mediante cirugía abierta, a una dosis celular de 3×10^6 células por cc de lesión.

El objetivo primario será evaluar la seguridad de la utilización del compuesto en el tratamiento quirúrgico de las pseudoartrosis atróficas de huesos largos mediante el registro de acontecimientos adversos y evaluar la eficacia mediante criterios radiográficos.

5. CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES

- El modelo animal de conejo con lesión unicortical en el húmero proximal es un modelo adecuado para el estudio de intervenciones en la reparación ósea.
- La cerámica hidroxiapatita-fosfato tricálcico 60/40 (Triosite®) es un vehículo adecuado para las ADSCh, siendo biocompatible, permitiendo la adhesión celular y su diferenciación osteoblástica en condiciones *in vitro* estándar.
- La adición de ADSCh a dosis de 3×10^6 células aumenta la producción de matriz ósea en un 34% a las 4 semanas en el modelo animal estudiado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pellettieri J, Sánchez Alvarado A. Cell turnover and adult tissue homeostasis: from humans to planarians. *Annu Rev Genet.* 2007;41:83-105.
2. Haeckel EHP. Zur Entwicklungsgeschichte der Siphonophoren. Utrecht: C. Van Der Post Jr; 1869.
3. Weismann A. The germ-plasm: a theory of heredity. New York, New York: Charles Scribner's Sons; 1893.
4. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science.* 1998(282):1145-7.
5. Till JE and McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961;14(2):213-222.
6. Siminovitch L, McCulloch EA and Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol.* 1963(3);62:327-36. doi: 10.1002/jcp.1030620313.
7. Potten CS, Schofield R, and Lajtha LG. A comparison of cell replacement in bone marrow, testis and three regions of surface epithelium. *Biochim Biophys Acta (BBA). Reviews on Cancer.* 1979;560(2):281-99.
8. Spangrude GJ, Heimfeld S, and Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988;241:58-62.
9. Loeffler M, Birke A, Winton D, and Potten C. Somatic mutation, monoclonality and stochastic models of stem cell organization in the intestinal crypt. *J Theor Biol.* 1993;160(4):471-91.
10. Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, and Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science.* 1999;283:534-7. doi: 10.1126/science.283.5401.534.
11. Miller JB, Schaefer L, and Dominov JA. Seeking muscle stem cells. *Curr Top Dev Biol.* 1999;43:191-219.
12. Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans B. R Soc Lond (B).* 1998;353:831-7. doi: 10.1098/rstb.1998.0247.
13. Richards RJ. The Tragic Sense of Life: Ernst Haeckel and the Struggle over Evolutionary Thought. Chicago: The University of Chicago Press; 2008.
14. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861-72.
15. Sánchez Alvarado A and Yamanaka S. Rethinking differentiation: Stem cells, regeneration, and plasticity. *Cell.* 2014;157(1):110-9. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.041.
16. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 2007;131(2):324-36.

17. Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer JG, and Morrison SJ. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell*. 2014;15(2):154-68. doi: 10.1016/j.stem.2014.06.008.
18. Mizoguchi T, Pinho S, Ahmed J, Kunisaki Y, Hanoun M, Mendelson A, et al. Osterix marks distinct waves of primitive and definitive stromal progenitors during bone marrow development. *Dev Cell*. 2014;29:340-9.
19. Chan CKF, Seo EY, Chen JY, Lo D, McArdle A, et al. Identification and Specification of the Mouse Skeletal Stem Cell. *Cell*. 2015;160:285-98.
20. Worthley DL, Churchill M, Compton JT, Tailor Y, Rao M. Gremlin 1 Identifies a Skeletal Stem Cell with Bone, Cartilage, and Reticular Stromal Potential. *Cell*. 2015;160:269-84.
21. Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, and Descalzi Cancedda F. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci*. 2000;113:59-69.
22. Tavassoli M, Crosby WH. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science*. 1968;161:54-56.
23. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Transplantation*. 1974;17:331-40.
24. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3:301-13.
25. Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26:2287-99.
26. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-7.
27. Sabatini F, Petecchia L, Tavian M, et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest*. 2005;85:962-71.
28. Waldmann J, Lindner U, Hellwig-Bürgel T, Jelkmann W, Lehnert H, Rohwedel J, Kramer J. Isolation and characterisation of mesenchymal stromal cells from adult mouse kidney. *J Stem Cells Regen Med*. 2010;6(2):112-3.
29. Bakhtina A, Tohfafarosh M, Lichtler A, Arinzeh TL. Characterization and differentiation potential of rabbit mesenchymal stem cells for translational regenerative medicine. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2014;50(3):251-60.
30. Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, and Wang C-Y. The meaning, the sense and the significance: Translating the science of mesenchymal stem cells into Medicine. *Nat Med*. 2013;19(1):35-42.

31. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31:890-6.
32. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105:1815-22.
33. González-Rey E, Anderson P, González MA, Rico L, Buscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*. 2009;58:929-39.
34. Zhao CP, Zhang C, Zhou SN, Xie YM, Wang YH, et al. Human mesenchymal stromal cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice. *Cytotherapy*. 2007;9:414-26.
35. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/SCID mice. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2006;103:17438-43.
36. Singer NG, and Arnold I. Caplan, Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2011;6:457-78.
37. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang JI, Futrell WJ, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-26.
38. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, de Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95.
39. Conget PA, and Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Physiol*. 1999;181:67-73.
40. Sánchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pérez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol*. 2000;64:247-56.
41. Kang SK, Putnam LA, Ylostalo J, Popescu IR, Dufour J, Belousov A, and Bunnell BA. Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells. *J. Cell Sci*. 2004;117(Pt 18):4289-99.
42. Safford KM, Safford SD, Gimble JM, Shetty AK, and Rice HE. Characterization of neuronal/glia differentiation of murine adiposederived adult stromal cells. *Exp. Neurol*. 2004;187:319-28.
43. Xu Y, Liu L, Li Y, Zhou C, Xiong F, Liu Z, et al. Myelin-forming ability of Schwann cell-like cells induced from rat adipose-derived stem cells *in vitro*. *Brain Res*. 2008;1239:49-55.
44. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, and Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2005;328:258-64.
45. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;41:1135-40.
46. Kim EH, Heo CY. Current applications of adipose-derived stem cells and their future perspectives. *World J Stem Cells*. 2014;6(1):65-8.
47. Aust L, Devlin B, Foster SJ, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004;6:7-14.

48. Delarosa O, Sánchez-Correa B, Morgado S, et al. Human adipose-derived stem cells impair natural killer cell function and exhibit low susceptibility to natural killer-mediated lysis. *Stem Cells Dev.* 2012;21:1333-43.
49. Doorn J, Moll G, Le Blanc K, et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012;18:101-15.
50. Delarosa O, Lombardo E, Beraza A, et al. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adiposederived stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2009;15:2795-806.
51. De la Portilla F, Alba F, García-Olmo D, Herrerías JM, González FX, Galindo A. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eADSCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial. *Int J Colorectal Dis.* 2013;28:313-23.
52. Lee SM, Lee SC, Kim SJ. Contribution of human adipose tissue-derived stem cells and the secretome to the skin allograft survival in mice. *J Surg Res.* 2014;188(1):280-9.
53. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 2013;15:641-8.
54. Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, et al. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem.* 2002;277(33):30177-82.
55. Colnot C. Skeletal Cell Fate Decisions within Periosteum and Bone Marrow During Bone Regeneration. *J Bone Miner Res.* 2009;24:274-82.
56. Shah K, Majeed Z, Jonason J, O'Keefe RJ. The role of muscle in bone repair: the cells, signals, and tissue responses to injury. *Curr Osteoporos Rep.* 2013;11(2):130-5.
57. Hoogduijn MJ, Verstegen MM, Engela AU, et al. No evidence for circulating mesenchymal stem cells in patients with organ injury. *Stem Cells Dev.* 2014;23(19):2328-35.
58. Burke DP, Kelly DJ. Substrate Stiffness and Oxygen as Regulators of Stem Cell Differentiation during Skeletal Tissue Regeneration: A Mechanobiological Model. *PLoS ONE.* 2012;7(7):e40737.
59. Burke D, Dishowitz M, Sweetwyne M, Miedel E, Hankenson KD, Kelly DJ. The role of oxygen as a regulator of stem cell fate during fracture repair in TSP2-null mice. *J Orthop Res.* 2013;31(10):1585-96.
60. Hirao M, Tamai N, Tsumaki N, Yoshikawa H, Myoui A. Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J Biol Chem.* 2006;281:31079-92.
61. Kanichai M, Ferguson D, Prendergast PJ, Campbell VA. Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: a role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . *J Cell Physiol.* 2008;216:708-15.

62. Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:1301-5.
63. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423:349-55.
64. Hadjiargyrou M, O'Keefe RJ. The Convergence of Fracture Repair and Stem Cells: Interplay of Genes, Aging, Environmental Factors and Disease. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2014;29(11):2307-22.
65. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial non-unions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986;205:299-308.
66. Le Guehennec L, Goyenvallée E, Aguado E, et al. Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. *J Biomed Mater Res.* 2005;72B:69-78.
67. Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J.* 1998;18:118-23.
68. Castañeda S, Largo R, Calvo E, Rodríguez-Salvanes F, Marcos ME, Díaz-Curiel M, Herrero-Beaumont G. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol.* 2006;35:34-41.
69. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987;2:595-610.
70. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am.* 1987;18:213-225.
71. Fu K, Xu Q, Czernuszka J, Triffitt JT, Xia Z. Characterization of a biodegradable coralline hydroxyapatite / calcium carbonate composite and its clinical implementation. *Biomed Mater.* 2013;8(6):065007.
72. Hing KA, Wilson LF, Buckland T. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *The Spine Journal.* 2007;7:475-90.
73. Herrera A, Mateo J, Gil-Albarova J, Lobo-Escolar A, Ibarz E, Gabarre S, et al. Cementless hydroxyapatite coated hip prostheses. *Biomed Res Int.* 2015;2015:386461.
74. Kuhne JH, Bartl R, Frisch B, Hammer C, Jansson V, Zimmer M. Bone formation in coralline hydroxyapatite. Effects of pore size studied in rabbits. *Acta Orthop Scand.* 1994;65:246-52.
75. Artzi Z, Weinreb M, Givol N, et al. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19:357-68.
76. Lu J, Blary MC, Vavasseur S, Descamps M, Anselme K, Hardouin P. Relationship between bioceramics sintering and micro-particles-induced cellular damages. *J Mater Sci Mater Med.* 2004;15:361-5.

77. Ransford AO, Morley T, Edgar MA, Webb P, Passuti N, Chopin D, et al. Synthetic porous ceramic compared with autograft in scoliosis surgery: a prospective, randomised study of 341 patients. *J Bone Joint Surg [Br]*. 1998;80-B:13-8.
78. Hooper NM, Schouten R and Hooper GJ. The Outcome of Bone Substitute Wedges in Medial Opening High Tibial Osteotomy. *The Open Orthopaedics Journal*. 2013;7:373-7.
79. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150:893-9.
80. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988;242:1528-34.
81. Lindholm TS, Urist MR. A quantitative analysis of new bone formation by induction in compositive grafts of bone marrow and bone matrix. *Clin Orthop Relat Res*. 1980;150:288-300.
82. Den Boer FC, Wippermann BW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Haarman HJ. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *J Orthop Res*. 2003;21:521-28.
83. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for non-unions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87:1430-7.
84. Seebach C, Schultheiss J, Wilhelm K, Frank J, and Henrich D. Comparison of six bone-graft substitutes regarding to cell seeding efficiency, metabolism and growth behaviour of human mesenchymal stem cells (MSC) *in vitro*. *Injury*. 2010;41(7):731-8.
85. Henrich D, Verboket R, Schaible A, Konradowitz K, Oppermann E, Brune JC, et al. Characterization of Bone Marrow Mononuclear Cells on Biomaterials for Bone Tissue Engineering In Vitro. *BioMed Research International*. 2015. Article ID: 762407;12 pages.
86. Court-Brown C, Koval K. The epidemiology of fractures, in Rockwood and Green's *Fracture in Adults*, 6th ed. Philadelphia, PA. Lippincott Williams & Wilkins. 2005;96-143.
87. Antonova E, Le TK, Burge R, Mershon J. Tibia shaft fractures: costly burden of non-unions. *BMC Musculoskelet Disord*. 2013;14:42.
88. Kanakaris NK, Giannoudis PV. The health economics of the treatment of long-bone non-unions. *Injury*. 2007;38(Supp 2):S77-S84.
89. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, and Ramírez-Vick JE. Scaffold Design for Bone Regeneration. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014;14(1):15-56.
90. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nature Biotechnology*. 2004;22:560-7.
91. Hui J, Li L, Teo Y, Ouyang H, Lee E. Comparative Study of the Ability of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Periosteum, and Adipose Tissue in Treatment of Partial Growth Arrest in Rabbit. *Tissue Eng*. 2005;11(5-6):904-12.

92. Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp N, Mehlhorn A, et al. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials*. 2010;31:3572-9.
93. Liu G, Zhang Y, Liu B, Sun J, Li W, Cui L. Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold. *Biomaterials*. 2013;34:2655-64.
94. Shah A, Cornejo A, Guda T, Sahar D, Stephenson S, Chang S, et al. Differentiated Adipose-Derived Stem Cell Cocultures for Bone Regeneration in Polymer Scaffolds *In Vivo*. *J Craniofac Surg*. 2014;25:1504-9.
95. Schaffler A, Buchler C. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells—Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *STEM CELLS*. 2007;25:818-27.
96. Nordström E, Ohgushi H, Yoshikawa T, Yokobori AT Jr, Yokobori T. Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on surface of microporous hydroxyapatite based mica composite and macroporous synthetic hydroxyapatite. *Biomed Mater Eng*. 1999;9(1):21-6.
97. Atayde L, Cortez P, Pereira T, Armada-da-Silva P, Afonso A, Lopes M, et al. A new sheep model with automatized analysis of biomaterialinduced bone tissue regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(8):1885-901.
98. Taylor DK, Meganck JA, Terkhorn S, Rajani R, Naik A, O'Keefe RJ, Goldstein SA, Hankenson KD. Thrombospondin-2 influences the proportion of cartilage and bone during fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2009;24(6):1043-54.
99. Zhao L, Zhao J, Wang S, Wang J, Liu J. Comparative study between tissue engineered periosteum and structural allograft in rabbit critical sized radial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011;97(1):1-9.
100. Dallari D, Fini M, Stagni C, Torricelli P, Aldini N, Giavaresi G, et al. *In Vivo* Study on the Healing of Bone Defects Treated with Bone Marrow Stromal Cells, Platelet-Rich Plasma, and Freeze-Dried Bone Allografts, Alone and in Combination. *J Orthop Res*. 2006;24:877-88.
101. Schlickewei CW, Laaff G, Andresen A, Klatte TO, Rueger JM, Ruesing J, Epple M, Lehmann W. Bone augmentation using a new injectable bone graft substitute by combining calcium phosphate and bisphosphonate as composite –an animal model. *J Orthop Surg Res*. 2015;25;10:116.
102. Sumner DR, Turner TM, Urban RM, et al. Locally delivered rhBMP-2 enhances bone ingrowth and gap healing in a canine model. *J Orthop Res*. 2004;22:58-65.
103. Wenisch S, Stahl JP, Horas U, Heiss C, Kilian O, Trinkaus K, Hild A, Schnettler R. *In vivo* mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: fine structural microscopy. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67(3):713-8.
104. Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S, Kessler P. Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. *J Biomed Mater Res*. 2002;63(2):115-21.

105. Dempster D, Compston J, Drezner M, Glorieux F, Kanis J, Malluche H, et al. Standardized Nomenclature, Symbols, and Units for Bone Histomorphometry: A 2012 Update of the Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Bone Miner Res.* 2013;28(1):2-17.
106. Dalle Carbonare L, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, et al. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. *Micron.* 2005;36(7-8):609-16.
107. Behr B, Tang C, Germann G, Longaker M and Quarto N. Locally applied VEGFA increases the osteogenic healing capacity of human adipose derived stem cells by promoting osteogenic and endothelial differentiation. *Stem Cells.* 2011;29(2):286-96.
108. Semyari H, Rajipour M, Sabetkish S, Sabetkish N, Abbas F, Kajbafzadeh A. Evaluating the bone regeneration in calvarial defect using osteoblasts differentiated from adipose-derived mesenchymal stem cells on three different scaffolds: an animal study. *Cell Tissue Bank.* doi: 10.1007/s10561-015-9518-5. Published online: June 25,2015.
109. Dudas J, Marra K, Cooper G, Penascino V, Mooney M, Jiang S, et al. The Osteogenic Potential of Adipose-Derived Stem Cells for the Repair of Rabbit Calvarial Defects. *Ann Plast Surg.* 2006;56:543-8.
110. Viateau V, Guillemin G, Bousson V, Oudina K, Hannouche D, Sedel L, et al. Long-Bone Critical-Size Defects Treated with Tissue-Engineered Grafts: A Study on Sheep. *Journal of Orthopaedic Research.* 2007;25(6):741-9.
111. Hao W, Dong J, Jiang M, Wu J, Cui F, Zhou D. Enhanced bone formation in large segmental radial defects by combining adipose-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 2 with nHA/RHLC/PLA scaffold. *Int Orthop.* 2010;34:1341-9.
112. De Girolamo L, Arrigoni E, Stanco D, Lopa S, Di Giancamillo A, Addis A, et al. Role of autologous rabbit adipose-derived stem cells in the early phases of the repairing process of critical bone defects. *J Orthop Res.* 2011;29(1):100.
113. Arrigoni E, Girolamo L, Giancamillo A, Stanco D, Dellavia C, Carnelli D, et al. Adipose-derived stem cells and rabbit bone regeneration: histomorphometric, immunohistochemical and mechanical characterization. *J Orthop Sci.* 2013;18:331-9.

ANEXOS

ANEXO I: LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS (Leyendas)

- Figura 1.** Cripta del epitelio intestinal.
- Figura 2.** Propuesta de Chan y cols. [19] del linaje de célula progenitora esquelética.
- Figura 3.** Modelo biomecánico de diferenciación celular durante la reparación ósea según Burke, 2012 [58].
- Figura 4.** Respuesta regenerativa a la fractura según Hadjiargyrou, 2014 [64].
- Figura 5.** Preparación para valoración de histomorfometría clásica.
- Figura 6.** Extracción de grasa del epiplón de conejo. **A.** Laparotomía. **B.** Grasa de epiplón. **C:** Lavado de la grasa.
- Figura 7.** Centrifugado de la grasa y obtención de la fracción vascular estromal.
- Figura 8.** Método ELISA para la detección de osteocalcina.
- Figura 9.** Gránulos de Triosite®.
- Figura 10.** Lesión monocortical de 3,5 mm en el húmero proximal en su cara lateral.
- Figura 11.** Gránulos de Triosite® preparados y su implantación.
- Figura 12.** RX de los húmeros: lesión unicortical (rojo), relleno con Triosite® (amarillo).
- Figura 13.** Microfotografía de espécimen cortado de forma longitudinal sobre la lesión a 10X.
A: cortical diafisaria. **B:** lesión unicortical. **C:** Triosite® relleno el defecto. **D:** médula ósea.
- Figura 14.** **A.** Siembra inicial. **B.** Primer lavado.
- Figura 15.** Imágenes a los 3 días, a los 6 días y a los 10 días de la siembra.
- Figura 16.** Imágenes del cultivo de ADSCh a 1.000 células/cm², a 1, 2, 4, 6, 8 y 11 días.
- Figura 17.** Curva de duplicaciones acumuladas.
- Figura 18.** Estudio de confluencia del cultivo.
- Figura 19.** Citometría ADSCh IB.

- Figura 20.** En nuestros cultivos, las células forman colonias de más de 50 células y mantienen un aspecto fibroblástico.
- Figura 21.** Las ADSCh mineralizan la matriz extracelular al cultivarlas con medio de diferenciación osteogénica durante 21-28 días (*derecha*) frente al medio de proliferación (*izquierda*), tinción realizada con Rojo Alizarina.
- Figura 22.** Cuantificación de la fosfatasa alcalina de los cultivos celulares en medio osteogénico.
- Figura 23.** Resultados obtenidos en la detección de osteocalcina de las ADSCh en medio de diferenciación osteogénico cultivadas en plástico.
- Figura 24.** Estudio del cariotipo de las células ADSCh utilizadas en los experimentos. Imagen de banda G.
- Figura 25.** A la *derecha*, Triosite® en medio de cultivo sin células, y a la *izquierda* con ADSCh a las 3 horas y 2 semanas en medio de proliferación, objetivándose la adhesión celular a la superficie del biomaterial.
- Figura 26.** Microfotografías de contraste de fase y por fluorescencia (células ADSCh modificadas genéticamente para expresar proteína verde fluorescente, GFP).
- Figura 27.** Triosite® original, con tinción Rojo de Alizarina sin ADSCh y con ADSCh.
- Figura 28.** ADSCh en Triosite®.
- Figura 29.** Niveles de osteocalcina en cultivo de ADSCh en Triosite®.
- Figura 30.** En las imágenes se muestran cortes histológicos con tinción de Hematosilina/Eosina del cultivo celular de ADSCh con Triosite®.
- A.** Sin medio osteogénico, **B.** A los 21 días con medio osteogénico.
- C.** A los 28 días con medio osteogénico. Se observa la presencia de células en contacto con la matriz de Triosite® en todas las preparaciones.
- Figura 31.** Control con radioscopia a la *izquierda* inmediatamente después de la realización de la lesión en el que se aprecia el orificio en diáfisis de fémur distal. A la *derecha* imagen de radioscopia tras la fractura a los 5 días.
- Figura 32.** Imagen de la fractura tras sacrificar al animal.
- Figura 33.** Conejo 7. Lesión unicortical bilateral en húmero proximal con Triosite®, estudio radiológico a las 3 semanas de la primera intervención.

- Figura 34.** En estas microfotografías se observan las características histológicas en tinción Hematosilina/Eosina en relación a la evolución de Triosite[®] (sin células) a 1, 2, 4, 6 y 8 semanas del implante (**Figuras A, B, C, D y E**, respectivamente).
A la *izquierda*: aumento original 100x, barra 200 µm; a la *derecha*: aumento original 400x, barra 50 µm.
- Figura 35.** Detalle a 400x en Hematosilina/Eosina de una muestra a las 4 semanas de la lesión en la que se observa la presencia de las lagunas de Howship (*asterisco*) sobre una trabécula, dentro de la cual se observan osteocitos nucleados en íntima relación con Triosite[®] (*flecha*).
- Figura 36.** Detalle a 400x en Hematosilina/Eosina de una muestra a las 4 semanas de la lesión en la que se observa la presencia de osteoclastos sobre Triosite[®], procediendo a la resorción del mismo. El fosfato tricálcico presenta en tinción Hematosilina/Eosina una coloración basófila de estructura amorfa.
- Figura 37.** Tinción con tricrómico de Masson a 100x a las 4 semanas. Con esta técnica se tiñen de color azul las fibras de colágeno. Se aprecia en esta preparación la cortical (**c**) interrumpida por la lesión producida en el ensayo, donde se aprecia Triosite[®] y la matriz extracelular neoformada (**o**).
- Figura 38.** Detalle a 400x tinción en Hematosilina/Eosina a las 4 semanas. Se observa el nuevo osteoide formado en el que se aprecian osteoblastos en hilera (**a**) y células embebidas en el osteoide: osteocitos (**b**).
- Figura 39.** Efecto de las ADSCh en la formación de matriz ósea en cada uno de los animales del estudio.
- Figura 40.** Efecto de las ADSCh en la formación de matriz ósea.
- Figura 41.** **A.** ADSCh marcadas con proteína verde fluorescente al microscopio de fluorescencia.
B. ADSCh marcadas con DAPI al microscopio de fluorescencia [83].
- Figura 42.** **A.** Preparación teñida con Tricrómico de Masson: matriz ósea, Triosite[®]. **B.** Preparación teñida con Hematoxilina/Eosina: matriz ósea, Triosite[®].
- Figura 43.** En los modelos animales descritos de reparación ósea con ADSCh la osificación que se produce es intramembranosa. **A.** Behr y cols. 2011 [106]. **B.** Estudio propio.

ANEXO I: LISTADO DE TABLAS (Leyendas)

- Tabla 1.** Marcadores de superficie.
- Tabla 2.** Experimentos realizados.
(Véase ***Figura 18***. *Curva de duplicaciones acumuladas*).
- Tabla 3.** Resultados de los experimentos. Valoración del estudio de confluencia del cultivo.
(Véase ***Figura 20***. *Curva de duplicaciones acumuladas*).
- Tabla 4.** Datos obtenidos sobre la cuantificación de la fosfatasa alcalina de los cultivos celulares en medio osteogénico.
- Tabla 5.** Resultados obtenidos en la detección de osteocalcina de las ADSCh en medio osteogénico de diferenciación cultivadas en plástico.
- Tabla 6.** Resultados de la expresión de fosfatasa alcalina de las ADSCh cultivadas en medio de diferenciación osteogénica en gránulos de Triosite®.
- Tabla 7.** Resultados de la expresión de osteocalcina de las ADSCh cultivadas en medio de diferenciación osteogénica en gránulos de Triosite®.
- Tabla 8.** Resumen de los resultados en la definición del modelo animal.
- Tabla 9.** Estudio histomorfométrico que presenta las medias de los *ratios* matriz extracelular/ Triosite® con sus desviaciones estándar.
- Tabla 10.** Resultados del estudio estadístico.
- Tabla 11.** Tabla resumen que muestra los resultados comparativos extraídos de la literatura sobre la capacidad osteoformadora de las células troncales.

ANEXO II: LISTADO DE ACRÓNIMOS

ADSC	células troncales derivadas de tejido adiposo (<i>adipose-derived stem cells</i>)
ADSch	células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (<i>human adipose-derived stem cells</i>)
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
BCSP	hueso, cartílago y progenitor estromal (<i>bone, cartilage and stromal progenitor</i>)
BD	programa <i>CellQuest Pro</i>
BGP	osteocalcina
BMSC	células troncales procedentes de médula ósea (<i>bone marrow stem cells</i>)
BMC	células procedentes de médula ósea
CFU-F	unidades formadoras de colonias de aspecto fibroblástico
CPD	duplicaciones de población acumuladas
DAPI	diamino fenilindol
DE	desviación estándar
DMEM	medio esencial modificado por Dulbecco
EDTA	ácido etilendiaminotetra acético
FA	fosfatasa alcalina
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
GFP	proteína verde fluorescente
hBMP-2	proteína ósea morfogenética
HE	Hematosilina/Eosina
HLA	antígeno leucocitario humano
HOST	osteocalcina humana
IDO	indolamina 2,3-dioxigenasa
IL	Interleukina
iPSC	células troncales pluripotentes inducidas (<i>induced pluripotent stem cells</i>)
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular (<i>International Society of Cellular Therapy</i>)
MO	medio osteogénico
MSC	células troncales mesenquimales
NIH	<i>National Institute of Health</i>
PBS	solución salina tamponada con fosfato
PFA	Paraformaldehído
Pre-BCSP	pre-hueso, cartílago y progenitor estromal

PROT	proteína
PRP	plasma rico en plaquetas
SC	<i>stem cells</i> (células troncales)
SFB	suero fetal bovino
TGF	factor transformante del crecimiento
TSP2	trombospondina-2
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEGFA	factor A de crecimiento endotelial vascular (<i>vascular endothelial growth A factor</i>)